



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS

Búsqueda de perfiles moleculares diferenciales entre tolerancia y sensibilización en la respuesta alérgica

Tesis Doctoral

Autor: Miriam Aguerri Moreno

Licenciada en Química y Bioquímica

Director: Dra. Blanca Cárdena Olombrada

Madrid, 2014



BLANCA CÁRDABA OLOMBRADA, DOCTOR EN BIOLOGÍA POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID E INVESTIGADOR DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (IIS-FJD).

CERTIFICA: Que Doña **Miriam Aguerri Moreno** ha realizado bajo mi dirección y supervisión el trabajo necesario para la realización de su Tesis Doctoral: **Búsqueda de perfiles moleculares diferenciales entre tolerancia y sensibilización en la respuesta alérgica.**

Revisado el trabajo, quedo conforme para su presentación y defensa como Tesis Doctoral, en la Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo la presente en Madrid a 18 de Diciembre del dos mil trece.

Blanca Cárdaba Olombrada

El trabajo presentado en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Inmunología del Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz (IIS-FJD) de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Blanca Cárdena y financiado por una beca de investigación Conchita Rábago y los proyectos FIS CP05/0183, PI07/0024, PI10/0025, una ayuda a la Investigación de la Fundación Ramón Areces y una ayuda de la Fundación de la SEAIC (2007).

Agradecimientos

Son muchas personas las que a lo largo de los años han contribuido en la elaboración de esta Tesis, tanto en su desarrollo directo como en la motivación necesaria para seguir adelante. Por ello quisiera dedicar estas páginas a expresar mi agradecimiento a todas ellas.

En primer lugar, quiero dar las gracias a la Dra. Blanca Cárdena por haberme permitido realizar este trabajo en su laboratorio, por la confianza que depositó en mí, por su dirección, sus conocimientos, sus ánimos para seguir adelante y su apoyo.

A todos los compañeros que han pasado por el laboratorio, de los que no solo he aprendido mucho, sino que han hecho de estos cuatro años una maravillosa experiencia. Con los que empecé, a la Dra. Soledad Gallardo, nuestra “Sole”, una de las personas más vitales que he conocido, y con la que siempre es un placer hablar. A Jose, mi primer compañero de laboratorio, del que tengo divertidos recuerdos, a Esther, nuestra técnica, un auténtico manojito de nervios pero siempre dispuesta a echar una mano. Y por supuesto, a David, que por siempre será mi becario favorito, y a la nueva generación, nuestra Selene, una pena no poder compartir más tiempo con ella.

Aunque ya no se encontraba en el laboratorio cuando llegué, al Dr. Carlos Lahoz, por todo el tiempo dedicado entre nosotros, sus sugerencias e ideas de las que tanto provecho hemos sacado.

También quisiera mencionar al que siempre consideré como la “otra mitad” de nuestro laboratorio. A la Dra. Victoria del Pozo, “Vito”, por sus consejos y tenacidad. A Esther López, que para mí fue un apoyo en mis primeros meses en el trabajo. A Bea, porque es una de esas personas que siempre necesitas, por su inteligencia, su capacidad de trabajo y su humanidad. A Cristina, nuestra “Cristi”, porque no es que llenaras el laboratorio, es que parece vacío sin ti. A Erika, una persona fantástica que en mi opinión se marchó demasiado pronto. A Mari Paz, que siempre transmite lo mejor de las cosas con un entusiasmo envidiable, a Vero, con la que me he reído muchísimo y que espero que siga así por mucho tiempo. A Ana, de la que pude disfrutar muy poco, pero que se ganó mi corazón rápidamente. Y también a Carla, la última en llegar por el momento, pero que le ha costado muy poco hacerse de querer.

No quisiera olvidarme de agradecer, a la Dra. Pilar Palomino, y a la Dra. Rosa García, por su ayuda siempre que la hemos necesitado, su cariño y su gran experiencia.

A todo el resto de compañeros del Departamento de Inmunología y de los grupos de investigación de la IIS-FJD, a Curra por esas maravillosas imágenes de microscopía confocal, a Ignacio Mahillo por su ayuda con la estadística, así como al personal auxiliar (en especial a Flor, Isabel, Pilar) y de limpieza (nuestra “Carmencita”). Sois muchos pero gracias a vosotros, en una u otra medida, mi trabajo ha sido más sencillo y ameno.

Por su colaboración en el suministro de los pacientes y muestras en el estudio, a los Doctores Fernando Florido, Joaquín Quiralte, Julio Delgado y Alfonso Miranda. Y por su gran colaboración en desentrañar los misterios de la genómica, al Dr. Jesús García Cantalejo, Pedro Botías y los Doctores Manuel Mata, David Montaner y Joaquín Dopazo.

Un agradecimiento para mi tutor en la Universidad Autónoma de Madrid, al Dr. Miguel Ángel Iñiguez, por ser tan buen tutor, estando siempre pendiente de sus doctorandos, y su gran paciencia.

Quisiera también agradecer a la Fundación Conchita Rábago por haberme permitido disfrutar de una beca de investigación, en especial a Marta Jiménez, que siempre se ha interesado por nuestro trabajo y por su calidez.

Aunque más alejados del mundillo científico, no puedo dejar de mencionar tampoco a mis amigos, los “de siempre”, que están ahí cuando los necesitas y los he necesitado mucho para sobrellevar los largos días de escritura. Sobre todo a aquellos que siempre preguntan: “¿Has descubierto ya algo?”

Todo este esfuerzo tampoco hubiera sido posible bajo el amparo de mi familia, mis padres, que siempre inculcaron desde que éramos pequeños la importancia del trabajo y del estudio, y por supuesto, a mi hermano, que siempre que hablábamos me preguntaba “cómo iba mi tesis”.

Y en último lugar, aunque podría ser perfectamente el primero, un agradecimiento muy especial a Fernando, marido reciente, pero que lleva muchos años dándome su apoyo y “aguantando” parte del peso de esta Tesis, sin él, probablemente nunca estuviera terminando estas líneas. Muchas gracias por todo.

*A veces sentimos que lo que hacemos es tan solo una gota en el mar, pero el mar sería menos
si le faltara una gota.*

Madre Teresa de Calcuta

RESUMEN

Objetivo: La sensibilización y la tolerancia (natural o inducida) frente a alérgenos puede deberse a múltiples y diferentes mecanismos. El objetivo principal de este estudio es encontrar diferencias moleculares que indiquen la aparición o no de la enfermedad, en la respuesta al polen de olivo, con el fin de definir biomarcadores y/o posibles dianas terapéuticas, que nos ayuden a mejorar el diagnóstico, pronóstico y/o el tratamiento.

Materiales y Métodos: Se seleccionaron 84 sujetos, clasificados clínicamente en 5 grupos: Grupo 1 (no alérgicos), Grupo 2 (asintomáticos, con anticuerpos IgE frente al polen de olivo), Grupo 3 (alérgicos, pero no al polen de olivo), Grupo 4 (alérgicos al polen de olivo, sin tratamiento) y Grupo 5 (alérgicos al polen de olivo tratados con inmunoterapia específica), de los que se obtuvieron suero y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) durante y fuera del periodo de polinización.

En el suero, se determinaron los niveles de IgE total y de los anticuerpos IgE, IgA e IgG4 específicos al polen de olivo, así como de un perfil de citocinas Th₁, Th₂, T_{reg} y Th₁₇. A partir de las PBMCs, se extrajo el RNA y se analizó la expresión del gen FOXP3 mediante qRT-PCR. La presencia de células reguladoras fue analizada mediante microscopía confocal en PBMCs en suspensión (sin fijación).

Por otro lado, se realizó un análisis masivo de expresión génica mediante microarrays, a partir de RNA obtenido de las PBMCs (durante y fuera del periodo de polinización) de 6 sujetos de cada grupo. Tras hacer análisis de calidad de los datos con programas específicos y obtener la expresión diferencial según las condiciones experimentales, se llevaron a cabo análisis funcionales con KEGG para rutas y con Gene-Ontology para los procesos biológicos, seleccionándose finalmente, 93 genes representativos y diferenciales que fueron validados por qRT-PCR.

Resultados: Los mayores niveles de anticuerpos IgE específicos se observaron en los sujetos alérgicos al polen de olivo (con o sin inmunoterapia), los sujetos tratados con inmunoterapia mostraron los niveles más altos de anticuerpos IgG4 específicos y los sujetos asintomáticos, los mayores niveles de IgE total. El resultado más relevante del análisis de citocinas fue el descenso de los niveles de TGF- β en los sujetos alérgicos al polen de olivo no tratados, durante la polinización. En este mismo grupo, se encontró un descenso en la expresión de FOXP3 y una menor cantidad de células reguladoras.

Los resultados de expresión génica masiva mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA), mostraron la buena clasificación clínica de los grupos, ya que, se obtuvieron 5 agrupamientos, que correlacionaban con los 5 grupos clínicos del estudio. Se encontraron genes y rutas diferenciales (relacionados o no con la respuesta inmuno-alérgica) entre los 5 grupos, siendo en general, mayores las diferencias entre los sujetos alérgicos y los controles (no alérgicos o asintomáticos). De los 93 genes validados por qRT-PCR, se confirmó que 35, además de mantener la significación, al ser analizados mediante un modelo jerárquico no supervisado, para clasificar las muestras según la expresión de estos genes, eran capaces de discriminar los distintos perfiles de respuesta al polen de olivo, con una buena sensibilidad y especificidad.

Conclusiones: Los resultados de la respuesta humoral, junto al descenso de TGF- β , FOXP3 y células reguladoras en los sujetos alérgicos al polen de olivo durante la polinización, sugieren un descenso de sus mecanismos reguladores, así como, una recuperación de estos, mediante la inmunoterapia específica.

El estudio diferencial de expresión génica masiva y su posterior validación por qRT-PCR, ha permitido definir un perfil de expresión de 35 genes, capaz de realizar una buena clasificación clínica entre los cuatro grupos de pacientes analizados y el grupo control de sujetos sanos. Estos genes, podrían ser útiles como futuras herramientas de mejora para el diagnóstico y el tratamiento de la alergia. Además, se han encontrado genes que nunca antes han sido relacionados con enfermedades alérgicas.

SUMMARY

Background: The reason why exposure to common environmental antigens induces allergic diseases in some people and not others remains undetermined. Different molecular mechanisms may modulate sensitization and natural or induced tolerance to allergens.

Objective: To search for differential molecular mechanisms in the olive pollen allergic response in an area with extremely high antigenic load during the pollen season.

Methods: The study population comprised 84 subjects clinically classified in 5 groups: Group 1, non-allergic; Group 2, asymptomatic, sensitized to olive pollen; Group 3, allergic other than olive pollen; Group 4, allergic to olive pollen (without treatment); and Group 5, allergic to olive pollen treated with specific immunotherapy.

Sera and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained during and outside the pollen season. Serum levels of total IgE, olive pollen-specific IgE, IgA, and IgG4 antibodies and Th₁, Th₂, Th₁₇, and Treg cytokines were analyzed. FOXP3 mRNA expression was determined in RNA extracted from PBMCs and the presence of regulatory T cells was analyzed by confocal microscopy in unfixed PBMCs.

Whole-genome expression profile in peripheral blood cells of the five groups in situations of both high and low exposure was analyzed by microarray technology. Ninety-three transcripts of the most representative and statistically significant genes in the gene-expression and biological analyses among the five groups, were validated by qRT-PCR in different subjects selected with the same criteria.

Results: Asymptomatic subjects showed the highest total IgE levels. The major difference found between untreated and treated patients was the highest levels of non-inflammatory antibodies (IgG4) in patients with treatment. The main result of cytokine analyses was the statistically significant decrease in TGF- β levels in untreated olive pollen allergic subjects (pollen season) compared with treated patients. This result correlated with the significant decreases in FOXP3 mRNA expression and the lower presence of regulatory T cells in PBMCs in the untreated olive pollen allergic patients during pollen season.

The results of gene expression profiling obtained by Principal Component Analysis (PCA) showed five clusters of samples that correlated with the five clinical groups. The analysis of differential gene expression revealed differential genes and pathways in the five groups, and in general, the greatest differences were found among allergic groups and controls. Moreover, 35 of the 93 genes reanalyzed by qRT-PCR were confirmed as being differentially expressed. These 35 genes permit to discriminate, with a specificity reaching the 90%, the 4 clinical groups from healthy controls by an unsupervised hierarchical model.

Conclusions: The results found in antibody, cytokine, mRNA levels and presence of regulatory cells point to a decrease in the cellular regulatory mechanisms mediated by TGF- β and FOXP3 in olive-pollen allergic patients that could be restored after specific-immunotherapy.

The massive gene study shows how a good clinical classification permits the clustering of five clinical conditions according to gene expression. The study has validated several genes/pathways that play an important role in allergy pathogenesis and identified novel genes/pathways which could be relevant in this and other allergic diseases. Finally, a possible molecular signature has been found for olive pollen allergy which could be useful for the diagnosis and treatment of this and other sensitizations.

ÍNDICE

	Página
<u>RESUMEN</u>	1
<u>SUMMARY</u>	5
<u>ÍNDICE</u>	7
<u>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</u>	11
<u>ABREVIATURAS</u>	15
<u>INTRODUCCIÓN</u>	19
1. Respuesta inmune frente a antígenos exógenos	19
1.1. Tolerancia del sistema inmune	19
1.1.1. Células reguladoras	19
1.2. La enfermedad alérgica	20
1.2.1. El proceso alérgico	20
1.2.2. Prevalencia y factores de riesgo	23
1.2.3. Teoría de la Higiene	25
1.2.4. Células reguladoras en la enfermedad alérgica	26
1.2.5. Tratamiento de las enfermedades alérgicas: inmunoterapia	27
2. Alergia al polen de olivo	28
2.1. Familia de las Oleáceas	28
2.2. Características de <i>Olea europaea</i>	28
2.3. Características de la polinosis por polen de olivo	29
3. Genética de las enfermedades alérgicas	30
3.1. Aproximaciones clásicas para el estudio genético	30
3.1.1. Genes asociados con las enfermedades alérgicas	31
3.2. Nuevas tecnologías para el estudio genético de enfermedades	32
3.2.1. Introducción a los microarrays de expresión génica	32
3.2.1.1. Microarrays y su utilización en la enfermedad alérgica	34
3.2.2. Microarrays de Affymetrix	35
3.2.3. Análisis de datos de microarrays	36
3.2.3.1. Análisis de Componentes Principales (PCA)	36

3.2.3.2. <i>Clustering</i> de genes obtenidos mediante microarrays	37
3.3. Genómica funcional	37
3.4. Genómica y direcciones futuras	38
<u>OBJETIVOS</u>	41
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	45
1. Diseño y sujetos de estudio	45
1.1. Variables y recogida de muestras	45
1.2. Pruebas cutáneas.....	45
1.3. Grupos de estudio	46
2. Procesamiento de muestras	46
2.1. Obtención de suero	46
2.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)	47
2.3. Obtención de DNA	48
2.4. Cuantificación de DNA o RNA.....	48
3. Respuesta humoral	49
3.1. Cuantificación de IgE total y de IgE, IgA e IgG4 específicos de <i>Olea europaea</i> en suero	49
4. Medida de citocinas solubles en suero	49
5. Análisis estadístico (anticuerpos y citocinas)	50
6. Medida de la respuesta celular reguladora	50
6.1. Descongelación de células.....	50
6.2. Extracción de RNA	51
6.3. Medida de la integridad de RNA.....	51
6.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la cuantificación de mRNA	53
6.4.1. Síntesis de DNA complementario (cDNA).....	53
6.4.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	53
6.4.3. Análisis estadístico.....	54
6.5. Microscopía confocal	54
6.5.1. Preparación y marcaje de las células	54
6.5.2. Análisis por microscopía confocal.....	55
7. Microarrays de expresión génica	55
7.1. Selección y preparación de muestras para microarrays.....	56

7.2.	Transcripción de RNA e hibridación con microarrays.....	56
7.2.1.	Transcripción	56
7.2.2.	Protocolo de hibridación	61
7.3.	Escaneado.....	63
7.4.	Normalización y corrección de datos	63
7.5.	Análisis del microarray	63
7.6.	Criterios para la selección de genes diferenciales	64
7.7.	Análisis funcional de los datos del microarray	64
8.	Validación de genes mediante qRT-PCR.....	65
8.1.	Selección de genes.....	65
8.2.	Selección de sujetos.....	65
8.3.	Preparación de las muestras	65
8.4.	Análisis de muestras por qRT-PCR en tarjetas microfluídicas	66
8.5.	Procesamiento de los datos de expresión génica obtenidos por qRT-PCR en tarjetas microfluídicas	66
8.6.	Análisis funcional de los datos de expresión génica obtenidos en tarjetas microfluídicas	66
	<u>RESULTADOS</u>.....	71
1.	Sujetos de estudio	71
2.	Niveles de IgE total y anticuerpos IgE, IgA e IgG4 específicos de <i>Olea europaea</i>	71
3.	Niveles de citocinas.....	76
4.	Respuesta celular reguladora.....	80
4.1.	Extracción de RNA	81
4.2.	Cuantificación relativa de la expresión génica de FOXP3.....	82
4.3.	Microscopía confocal	83
5.	Análisis diferencial de expresión génica entre grupos clínicos	84
5.1.	Muestras de RNAs para su estudio mediante microarrays de expresión génica.....	84
5.2.	Análisis globales.....	86
5.3.	Análisis de la expresión génica diferencial entre grupos clínicos.....	89
5.4.	Validación de la expresión génica por qRT-PCR	102

5.5. Análisis funcional de los genes validados por qRT-PCR.....	112
<u>DISCUSIÓN</u>	117
<u>CONCLUSIONES</u>	135
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	139
<u>ANEXO I: Rutas KEGG y <i>Heat maps</i></u>	167
<u>ANEXO II: Publicaciones a las que ha dado lugar esta tesis</u>	183

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Índice de Figuras

	<u>Página</u>
Figura 1. Sensibilización al alérgeno y desarrollo de células B específicas	21
Figura 2. Fase efectora.....	22
Figura 3. Interacción medioambiente y genética	25
Figura 4. Papel de las células reguladoras en las enfermedades alérgicas	27
Figura 5. Efectos de la inmunoterapia específica (SIT)	28
Figura 6. Tipos de microarrays: cDNA y oligonucleótidos.....	33
Figura 7. Disección de un array de oligonucleótidos	34
Figura 8. Fraccionamiento de sangre completa por gradiente de densidad.....	47
Figura 9. Imagen de 6000 RNA Nano <i>ladder</i>	52
Figura 10. Gráfica de una muestra de RNA de buena calidad.....	53
Figura 11. Doble transcripción <i>in vitro</i>	61
Figura 12. Niveles de IgE total y anticuerpos específicos (IgE, IgG4, IgA) frente al polen de olivo durante y fuera de la polinización	72
Figura 13. Relación entre anticuerpos	75
Figura 14. Porcentaje de sujetos con niveles detectables de citocinas IL-4 e IL-5	79
Figura 15. Niveles medios de TGF- β en suero	80
Figura 16. Ejemplo de calidad y pureza de RNA	81
Figura 17. Expresión relativa de mRNA de FOXP3	82

Figura 18.	Imágenes de microscopía confocal (expresión de CD4, CD25 y FOXP3 en PBMCs).....	83
Figura 19.	Expresión génica de FOXP3 en PBMCs analizadas con microscopía confocal.....	84
Figura 20.	Análisis por ANOVA de fuentes de variación en el estudio.....	87
Figura 21.	Análisis de fuentes de variación, eliminando la fecha de escaneado	88
Figura 22.	Análisis por PCA de separación de los grupos experimentales	89
Figura 23.	Vías funcionales diferenciales entre Alérgicos al polen de olivo y controles No alérgicos.....	97
Figura 24.	Ejemplo de vía diferencialmente incrementada (Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Asintomáticos)	99
Figura 25.	Ejemplo de vía diferencialmente disminuida o reprimida (Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Asintomáticos)	100
Figura 26.	Gráfica “ <i>Heat-map</i> ” (Alérgicos al polen de olivo no tratados vs No Alérgicos durante la polinización).....	110
Figura 27.	Gráficas “ <i>Heat-map</i> ”: comparaciones de distintos grupos clínicos vs controles No Alérgicos.....	111
Figura 28.	Imagen obtenida con la base de datos STRING: red de interacción para las 35 proteínas de los genes diferenciales	114

Índice de Tablas

	<u>Página</u>
Tabla 1.	Composición del <i>Buffer</i> Poli-A/oligo (dT)-T7.....
Tabla 2.	Mezcla de reacción RNA / <i>Buffer</i> Poli-A/oligo (dT)-T7
Tabla 3.	Mezcla de reacción para la síntesis de la primera cadena de cDNA del primer ciclo
Tabla 4.	Mezcla de reacción para la síntesis de la segunda cadena de cDNA del primer ciclo
Tabla 5.	Mezcla de reacción IVT

Tabla 6.	Mezcla de reacción para la síntesis de la primera cadena de cDNA del segundo ciclo	59
Tabla 7.	Mezcla de reacción para la síntesis de la segunda cadena de cDNA del segundo ciclo	59
Tabla 8.	Mezcla de reacción para el marcaje de cRNA con biotina	60
Tabla 9.	Características clínicas y demográficas de los sujetos de estudio	71
Tabla 10.	Niveles medios de citocinas en suero.....	77
Tabla 11.	Resultados medios de cantidad y calidad de RNA.....	81
Tabla 12.	Características clínicas y demográficas de los sujetos seleccionados para el análisis por microarrays	85
Tabla 13.	Muestras de RNAs analizadas por microarrays de expresión génica	85
Tabla 14.	Análisis preliminar de genes diferencialmente expresados.....	90
Tabla 15.	Expresión diferencial de genes entre los distintos grupos.....	92
Tabla 16.	Resumen del análisis del enriquecimiento de vías funcionales (“KEGG <i>pathways</i> ”)	93
Tabla 17.	Resumen del análisis del enriquecimiento de procesos biológicos (“GO <i>terms</i> ”)	95
Tabla 18.	Resumen del análisis del enriquecimiento de procesos biológicos No redundantes	96
Tabla 19.	Genes relevantes en las comparaciones frente a pacientes alérgicos al polen de olivo no tratados	101
Tabla 20.	Características clínicas y demográficas de los sujetos seleccionados para la validación de genes	102
Tabla 21.	Muestras seleccionadas para la validación de genes relevantes.....	103
Tabla 22.	Genes seleccionados para validación por qRT-PCR.....	105
Tabla 23.	Clasificación funcional de genes mediante el programa DAVID.....	113

Índice de Figuras y Tablas de los Anexos

	Página
Tabla 1.	Rutas KEGG significativas fuera de la polinización.....167
Tabla 2.	Rutas KEGG significativas durante la polinización.....171
Figura 1.	Controles No alérgicos vs sujetos Asintomáticos fuera del periodo de polinización175
Figura 2.	Controles No alérgicos vs Alérgicos no relacionados al polen de olivo fuera del periodo de polinización176
Figura 3.	Controles No alérgicos vs Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento fuera del periodo de polinización.....176
Figura 4.	Controles No alérgicos vs Alérgicos al polen de olivo con tratamiento específico fuera del periodo de polinización.....177
Figura 5.	Controles No alérgicos dentro (Pre) y fuera del periodo de polinización (Post).....177
Figura 6.	Sujetos asintomáticos dentro (Pre) y fuera del periodo de polinización (Post).....178
Figura 7.	Alérgicos no relacionados dentro (Pre) y fuera del periodo de polinización (Post).....178
Figura 8.	Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento dentro (Pre) y fuera del periodo de polinización (Post)179
Figura 9.	Alérgicos al polen de olivo con tratamiento específico dentro (Pre) y fuera del periodo de polinización (Post)179

ABREVIATURAS

18S	Subunidad de 18 unidades Svedberg del ribosoma (gen utilizado como endógeno)
ANOVA	Análisis de la Varianza
APC	Aloficocianina
AU	Unidades arbitrarias
CD	Marcador de superficie molecular <i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	DNA complementario
DAVID	Base de datos con herramientas de anotación (<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleótido
ELISA	Enzimoimmunoensayo de adsorción
FcεR	Receptor de la fracción cristalizable tipo épsilon (receptor de IgE)
FDR	Proporción de falsos positivos (<i>False Discovery Rate</i>)
FOXP3	<i>Forkhead box 3</i> (gen marcador de regulación inmune)
g	Fuerza centrífuga relativa
GAPDH	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (gen utilizado como endógeno)
GEO	Base pública para datos experimentales de microarrays (<i>Gene Expression Omnibus</i>)
GO	Base de datos <i>Gene Ontology</i>
GWAS	Estudios de asociación masivos (<i>Genome-wide association study</i>)
HLA	Antígeno leucocitario humano
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
INF-γ	Interferón gamma
KEGG	Base de datos <i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>

LOR	Logaritmo de <i>odd ratio</i> (desigualdad relativa)
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
mRNA	RNA mensajero
p	Valor de p (estadístico)
PBMCs	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino (<i>buffer</i>)
PCA	Análisis de Componentes Principales
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PS	Pares de oligonucleótidos que representan un gen en un microarray (<i>Probeset</i>)
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosomal
SIT	Inmunoterapia específica
SNP	Polimorfismo de un único nucleótido
STRING	Base de datos de interacciones proteicas (<i>Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins</i>)
TCR	Receptor de células T
TGF- β	Factor de crecimiento transformante beta
Th	Célula T <i>helper</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Célula T reguladora
UI	Unidades internacionales

INTRODUCCIÓN

1. Respuesta inmune frente a antígenos exógenos

La respuesta frente a antígenos extraños puede ser inmunogénica o tolerogénica, dependiendo en gran medida de la forma fisicoquímica, dosis y vía de administración del antígeno (Doan, T. y cols., 2007). La exposición de un individuo a antígenos inmunogénicos estimula la inmunidad específica y su contacto posterior genera respuestas secundarias mayores. Por el contrario, la exposición a antígenos tolerogénicos no sólo no induce inmunidad, sino que inhibe la activación linfocitaria por la posterior administración de formas inmunogénicas del mismo antígeno. Así, la tolerancia no es una pérdida pasiva de respuesta, sino una falta de respuesta como consecuencia del reconocimiento del antígeno específico.

La activación o la tolerancia que surgen como resultado del reconocimiento del antígeno por los linfocitos dependen de su estadio de maduración, de la naturaleza del estímulo inmunológico y en el caso de las células T, la naturaleza de las células presentadoras de antígeno.

1.1. Tolerancia del sistema inmune

Globalmente, se han consensuado dos tipos principales de tolerancia: central y periférica (Xing, Y., Hogquist, K.A., 2012). La tolerancia central se induce en los linfocitos inmaduros dentro de los órganos linfoides y es importante para mantener la falta de respuesta frente a los antígenos propios, pero no actúa en la tolerancia frente a los antígenos administrados en la periferia. La tolerancia frente a estos antígenos extraños, llamada tolerancia periférica, se induce en linfocitos maduros en determinadas condiciones, siendo su mecanismo más habitual la anergia o la eliminación clonal.

Pero también es posible perder la capacidad de respuesta a un antígeno determinado, a pesar de la presencia de linfocitos maduros que responden al antígeno. En esta situación, el crecimiento y diferenciación de los linfocitos inmunocompetentes pueden ser inhibidos activamente mediante otros mecanismos, entre los que destacan los relacionados con las células reguladoras o supresoras (Sakaguchi, S. y cols., 2009).

1.1.1. Células reguladoras

Hay evidencias de la existencia de una gran variedad de células supresoras o reguladoras, que aparecen durante el desarrollo normal del sistema inmune (las células Treg naturales o nTregs) o en respuesta a una exposición antigénica concreta (las células Treg adaptativas o inducidas) (Bluestone, J.A. y cols., 2003). Las mejor caracterizadas son las que expresan CD4 y altos niveles de CD25 en superficie y al contrario que otras células T CD4⁺, tras ser estimuladas con un antígeno, no producen citocinas efectoras, sino que suprimen la proliferación o secreción de otros tipos celulares (las células T efectoras). Otras células con capacidad reguladora son las CD8⁺, células T $\gamma\delta$, CD4⁺CD8⁻, células B (Kalampokis, I. y cols., 2013), células NK productoras de IL10 y algunos tipos de macrófagos (Palomares, O. y cols., 2010).

La capacidad supresora de células T CD4⁺ se demostró en modelos murinos de los años 80 y 90 (Hall, B.M. y cols., 1985, Powrie, F. y cols., 1990). Desafortunadamente, su repercusión no fue inmediata por la dificultad de distinguir células reguladoras de células efectoras. Aunque se demostró que CD25 era un marcador funcional de células reguladoras (Sakaguchi, S. y cols., 1995), también se expresaba en células T activadas.

No fue hasta principios del siglo XXI cuando se descubrió que los pacientes con defectos en el gen FOXP3 desarrollaban una enfermedad denominada síndrome de

Inmunodeficiencia Poliendocrino-Enteropática ligada a X (IPEX), caracterizada por una disregulación inmune que podía originar múltiples enfermedades autoinmunes y enfermedades atópicas (Bennett, C.L. y cols., 2001). Posteriormente, en modelos murinos se demostró que FOXP3 era esencial para el desarrollo de células reguladoras T CD4⁺CD25⁺ y que su expresión ectópica confería función supresora en las células T CD4⁺CD25⁻ (Fontenot, J.D. y cols., 2003, Smyk-Pearson, S.K. y cols., 2003, Akbar, A.N. y cols., 2003). Además, el fenotipo supresor se mantenía en gran parte gracias a la expresión de altos niveles de FOXP3, ya que su eliminación o reducción limitaba la habilidad supresora de las células T CD25⁺, mientras que añadir FOXP3 a células efectoras T CD25⁻ aumentaba su capacidad supresora (Hori, S. y cols., 2003, Khattri, R. y cols., 2003, Wan, Y.Y. y cols., 2007). Aún no está claro cómo FOXP3 aumenta la capacidad reguladora, pero se sabe que inhibe el factor de transcripción RORγT (implicado en el desarrollo de células Th₁₇) (Chen, Z. y cols., 2011) y a su vez es inhibido por los factores transcripcionales T-bet (asociado a células Th₁) y GATA3 (asociado a células Th₂) (Wei, J. y cols., 2007, Mantel, P.Y. y cols., 2007). Recientemente, se ha demostrado que en las células nTreg, FOXP3 puede interactuar directamente con el factor de transcripción RUNX1, que disminuye la expresión de IL-2 e IFN-γ y aumenta la actividad supresora (Ono, M., y cols., 2007). Así mismo, se ha demostrado un nuevo mecanismo que une a TGF-β y FOXP3 en humanos, ya que la inducción de RUNX1 y RUNX3 por TGF-β es esencial en la generación y en la función de células Treg (Klunker, S. y cols., 2009).

Aunque se han descrito otros marcadores potenciales de la actividad reguladora (GITR o CTLA-4), FOXP3 sigue considerándose uno de los más fiables, aunque su localización intracelular dificulta el aislamiento directo de las células Treg.

1.2. La enfermedad alérgica

Otro tipo especial de respuesta inmunológica frente a sustancias habitualmente inocuas fue definido como alergia en 1906. Se considera que la condición alérgica tiene una importante predisposición individual, frecuentemente hereditaria (atopia). El término atopia (del Griego *atopos*, que significa *fuera de lugar*) fue definido por Coca y Cooke en 1923 para referirse al estado de hipersensibilidad anómala de ciertos individuos, originando asma, rinitis y dermatitis asociada con pruebas cutáneas positivas inmediatas frente a antígenos ambientales. Se define como una tendencia familiar o individual a producir anticuerpos IgE en respuesta a bajas dosis de antígenos (alérgenos), normalmente proteicos, y a desarrollar síntomas como rinoconjuntivitis, asma o eczema/dermatitis, motivo por el cual los términos alergia y atopia se utilizan indistintamente para designar globalmente estas enfermedades.

Aunque los sujetos atópicos pueden presentar diversos cuadros clínicos, en todos ellos se detectan niveles elevados de IgE y entre un 65-80% de los enfermos presentan antecedentes familiares (Pepper, I., 1994). El modo de herencia es poligénica multifactorial, es decir, intervienen múltiples genes y factores medioambientales

1.2.1. El proceso alérgico

Según la clasificación de Gell y Coombs, la respuesta alérgica es causada por un mecanismo inmunológico denominado Hipersensibilidad mediada por IgE (anafiláctica, inmediata o de tipo I). Estas reacciones son causadas por la liberación de mediadores inflamatorios por parte de leucocitos, basófilos y mastocitos, como consecuencia de la interacción entre los anticuerpos IgE unidos a la membrana de dichas células con el

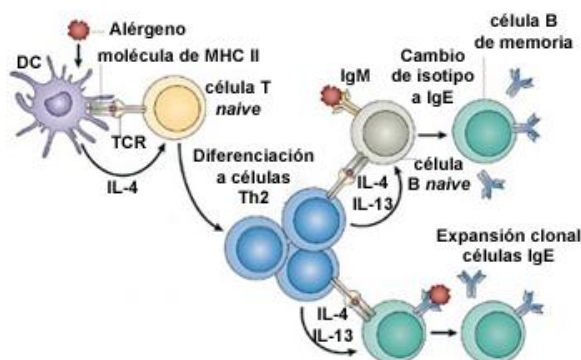
antígeno. Según la vía de acceso y el grado de difusión, las reacciones alérgicas pueden adquirir forma localizada (rinitis, asma, etc...) o generalizada (reacción anafiláctica).

Aunque las bases moleculares y celulares no están definidas con exactitud, el desarrollo de una respuesta alérgica se divide en dos etapas: sensibilización y fase efectora.

Sensibilización: El proceso de sensibilización frente al alérgeno (crítico para que un sujeto desarrolle alergia) implica la producción de anticuerpos IgE específicos. Para producirse IgE, el alérgeno sufre un doble reconocimiento. Por un lado, las células presentadoras de antígeno procesan al alérgeno para, a continuación, digerirlo y fragmentarlo en péptidos que se presentan en su superficie asociados al complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II). Las células T $CD4^+$ han de activarse mediante la unión de su receptor (TCR) con el antígeno asociado al MHC-II de la célula presentadora de antígeno.

Por otro lado, las células B reconocen al antígeno intacto gracias a las inmunoglobulinas que poseen en su membrana (IgM). Tras ocurrir este proceso, la célula T activará al linfocito B que haya reconocido el antígeno con sus inmunoglobulinas de superficie. La célula T $CD4^+$ liberará entonces citocinas para que el linfocito B se diferencie en célula plasmática secretora de inmunoglobulinas, originando el cambio de isotipo a IgG, IgA o IgE (Figura 1). En esta señal, se pueden diferenciar dos tipos de respuesta inmune: la respuesta Th_2 (T *helper*), que provoca la producción de citocinas IL-4 e IL-13, favoreciendo la síntesis de IgE, y la respuesta Th_1 , que involucra a las citocinas IL-2 e IFN- γ , favoreciendo la producción de IgG.

Figura 1. Sensibilización al alérgeno y desarrollo de células B específicas



La diferenciación y expansión clonal de las células Th_2 específicas de alérgeno conduce a la producción de IL-4 e IL-13, las cuales inducen el cambio de isotipo a IgE. El anticuerpo IgE en la superficie de las células B específicas de alérgeno facilita la presentación antigénica. La activación celular en presencia de IL-4 aumenta la diferenciación a células Th_2 . Adaptado de Larché, M.Y. y cols., 2006.

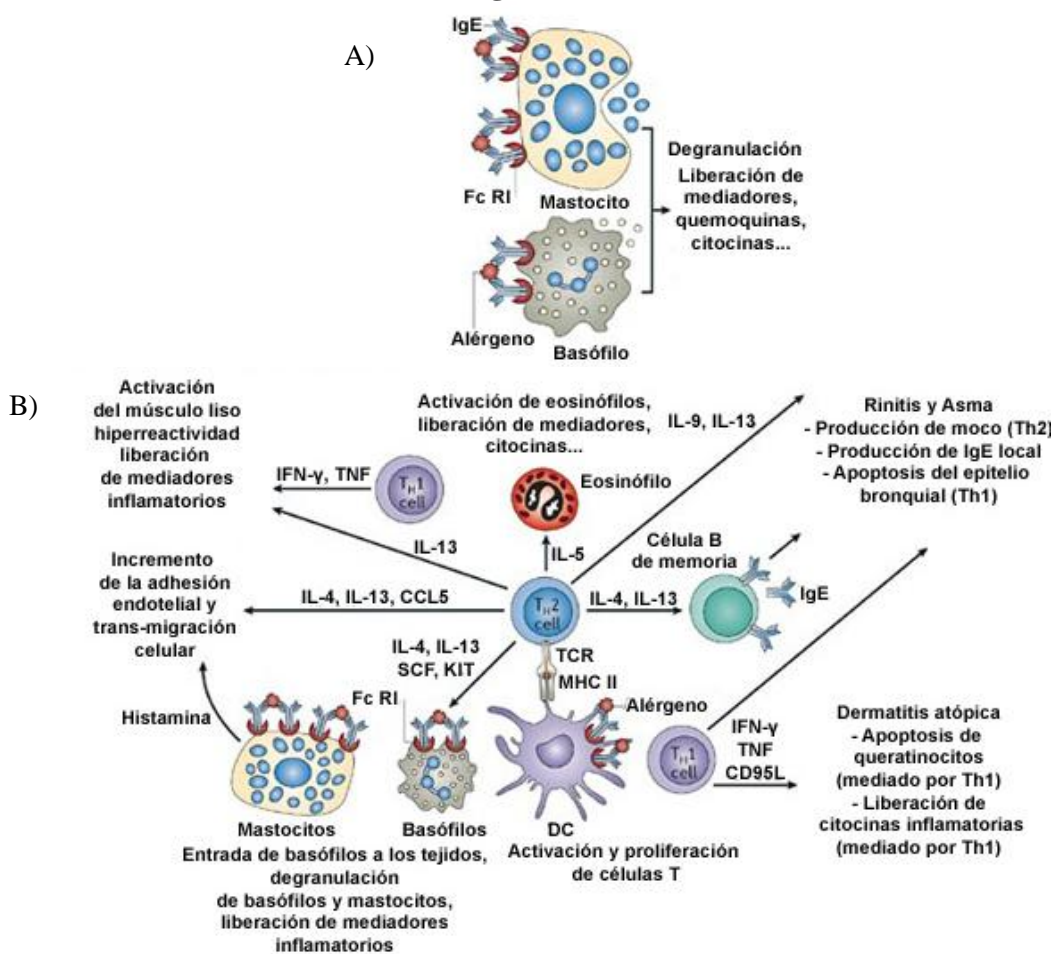
Los anticuerpos IgE producidos tras este primer contacto con el antígeno, se unen a los receptores de alta afinidad para la IgE, Fc ϵ RI, localizados en la membrana celular de los mastocitos y basófilos.

Fase efectora: Tras la sensibilización, en una segunda toma de contacto con el alérgeno, este se une a la IgE específica fijada a los receptores Fc ϵ RI, provocando su entrecruzamiento y la transducción de señales intracelulares que conducen a la liberación de una gran cantidad de mediadores almacenados en los gránulos del citoplasma celular, como histamina, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, citocinas y proteasas, que darán lugar a la inflamación (Figura 2.A). La vasodilatación local atraerá al área a otras células inflamatorias como eosinófilos, basófilos y células T

activadas. Estos procesos se manifiestan clínicamente con síntomas nasojuntivales y respiratorios, como conjuntivitis, obstrucción nasal y de las vías aéreas inferiores.

Unos minutos después de entrar en contacto con el alérgeno, y debido a la degranulación de los mastocitos, se desencadena la respuesta alérgica temprana. Si la exposición alérgica ha sido elevada, a esta fase le sigue una fase tardía (Figura 2.B) provocada por la acumulación de las células atraídas hacia la zona (Carlson, M. y cols., 1992). Este proceso se considera el principal responsable de la hiperreactividad inespecífica, que origina sintomatología frente a irritantes directos como contaminantes, tabaco, etc. y la persistencia de síntomas más allá de la exposición al alérgeno.

Figura 2. Fase efectora



A) Fase temprana: el entrecruzamiento de los receptores $Fc\epsilon RI$ debido a la unión del anticuerpo IgE con el alérgeno, provoca la liberación de histamina, mediadores lipídicos (como la prostaglandina D, factor de activación plaquetario, leucotrienos...), quimiocinas y otras citocinas (IL-4, IL-5, IL-13). Este proceso lleva a los síntomas inmediatos de la enfermedad alérgica. B) Fase tardía: bajo la influencia de citocinas y quimiocinas, las células migran al lugar de exposición, donde se reactivan y se produce la expansión clonal. La IgE local facilita la presentación antigénica, incrementando la activación celular. Los eosinófilos son uno de los tipos celulares más inflamatorios. Las células Th_1 producen interferón γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF), contribuyendo a la apoptosis de los queratinocitos, del epitelio bronquial y de las células del músculo liso. Adaptado de Larché, M. Y. y cols., 2006.

La inflamación crónica, como sucede en el asma bronquial, puede producir lesiones irreversibles, al producirse fibrosis y remodelado de la vía aérea. En su forma más severa puede llegar a ocasionar la muerte del individuo por obstrucción de las vías respiratorias y colapso cardiovascular (shock anafiláctico).

1.2.2. Prevalencia y factores de riesgo

Las enfermedades alérgicas han aumentado considerablemente en los países industrializados, en los últimos 20 años (García, D.P. y cols., 1999, World Health Organization, 1995), catalogándose entre las enfermedades mundiales más prevalentes y por tanto, consideradas un importante problema de salud que conlleva, además de un alto absentismo escolar y laboral, un elevado gasto económico a nivel mundial. La prevalencia estimada a nivel mundial varía ampliamente: una media de 22,7 % en Europa (Bauchau, V. y cols., 2004), 12-30 % en Norteamérica (Nathan, R.A. y cols., 2008), 7,2-54 % en África, 5,5-45 % Latinoamérica, 1,3-43% en China (Katelaris, C.H. y cols., 2012), siendo en general, los datos “del primer mundo” más uniformes. En España la prevalencia en adultos se estima en un 21,6% (Gaig, P. y cols., 2004).

La sensibilización a los pólenes o polinosis, es junto con los ácaros del polvo, una de las causas más frecuentes de alergia en todo el mundo.

La alergia presenta una agregación familiar que sugiere la existencia de una base genética (Sibbald, B. y cols., 1980, Hopp, R.J. y cols., 1984, Duffy, D.L. y cols., 1990). Sin antecedentes familiares, un niño tiene un riesgo de ser atópico del 5%, pudiendo llegar al 75% si ambos padres son alérgicos. De hecho, como se detalla más adelante, múltiples genes se han asociado con la mayor predisposición a padecer enfermedades alérgicas. Pero además, también existe un alto componente ambiental de riesgo. Así, la concentración de alérgenos en el ambiente, contaminación, clima, edad, sexo, infecciones respiratorias, tabaquismo, medicamentos, etc. son desencadenantes o moduladores relacionados con la enfermedad alérgica.

Factores endógenos, como la edad y el sexo del individuo están asociados al desarrollo de la respuesta alérgica. Se ha demostrado la mayor susceptibilidad a la sensibilización alérgica durante la infancia, en niños varones con un historial familiar de alergia (Hattevig, G. y cols., 1987, Cortés, X. y cols., 1998, Caro Rebollo, J. y cols., 2010). Sin embargo, en la edad adulta se ha descrito una mayor prevalencia en mujeres (Caig, P. y cols., 2004, Bauchau, V. y cols., 2004).

Múltiples factores extrínsecos como la exposición a alérgenos, especialmente durante la infancia, pueden facilitar la sensibilización alérgica. De hecho, parece que los niños que nacen en primavera, cuando hay más carga ambiental de polen, tienen mayor propensión a padecer polinosis que los nacidos en otras estaciones (Björkstén, F. y cols., 1981). También se ha descrito cómo el contacto de niños atópicos con perros y gatos está relacionado con la sensibilización al epitelio de estos animales (Warner, J.O. y cols., 1990) aunque también existen datos contradictorios, como demuestran diferentes meta-análisis (Takkouche, B. y cols., 2008, Lødrup, C. y cols., 2012) y revisiones de la literatura (Ahlbom, A. y cols., 1998, Chen, C.M. y cols., 2010, Apelberg, B.J. y cols., 2001, Pearce, N. y cols., 2000). Los productos microbianos (con alto contenido de endotoxinas) son especialmente abundantes en ambientes donde existen animales, como las granjas o casas con animales domésticos (Reed, C.E. y cols., 2001), lo que provoca que los niños que crecen en ambientes “rurales” tengan una prevalencia menor de sensibilización atópica, aunque únicamente cuando se exponen antes del año de vida (Von Mutius, E., 2004). La exposición materna a los animales de granja durante el embarazo y la lactancia aporta aún mayor protección (Riedler, J. y cols., 2001).

Es decir, no siempre existe una correlación lineal entre exposición y sensibilización, y de hecho, la exposición a niveles altos de alérgenos de gato se asocia con una respuesta Th₂ “modificada” (Platts-Mills, T. y cols., 2001) con una producción de IgG4 en suero en ausencia de IgE, en sujetos no alérgicos, postulándose que IL-10 podría jugar un papel regulador en la producción de estos anticuerpos. Este tipo de

respuesta también ha sido constatada en cuidadores de animalarios (Platts-Mills, T. y cols., 1987), en apicultores (Akdis, C.A. y cols., 1996) y en la exposición a altas dosis de polen de olivo (Geller-Bernstein, C. y cols., 2002, Cárdbaba, B. y cols., 2007). Se desconoce aún si estos aparentes efectos protectores son debidos a tolerancia inmunogénica por dosis elevadas (Platts-Mills, T. y cols., 2001, Hesselmar, B. y cols., 2003), a la exposición simultánea con endotoxinas, a factores genéticos o a la combinación de varios mecanismos.

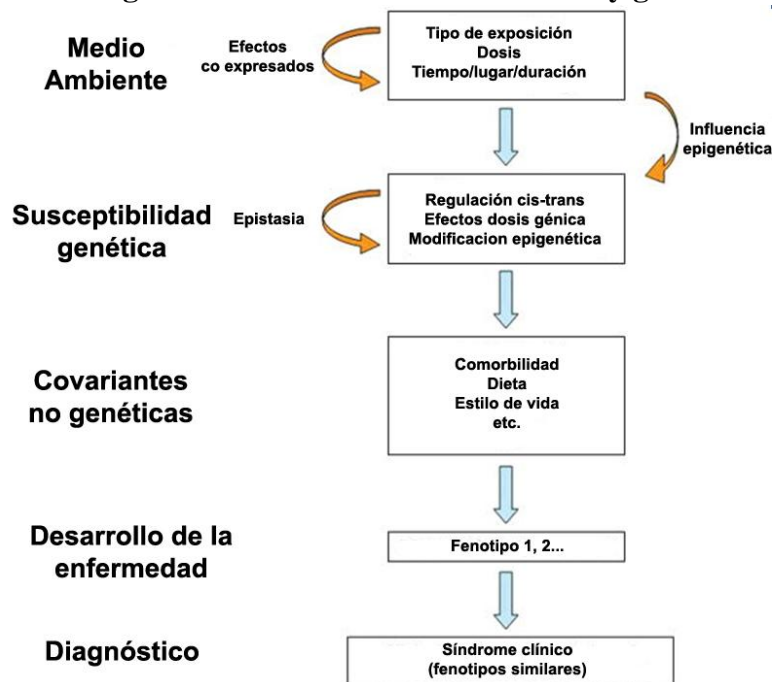
Por otro lado, a pesar de que las infecciones virales están relacionadas con ataques de asma y el desarrollo de alergia (Busse, W.W. y cols., 1997), se sugirió que una alta incidencia de afecciones respiratorias podría proteger frente al desarrollo de la respuesta alérgica (von Mutius, E. y cols., 1994).

También los contaminantes atmosféricos como el ozono, NO₂, SO₂, el tabaco o el humo de los coches, pueden actuar como agentes adyuvantes en la sensibilización alérgica. Se ha observado que las partículas de diesel pueden actuar sobre las células B, estimulando la síntesis de IgE (Takenaka, H. y cols., 1995) o interaccionar con los granos de polen aumentando su alergenidad (Knox, R.B. y cols., 1997).

Para entender todos estos resultados tan dispares, hay que tener en cuenta la influencia de múltiples factores medioambientales, tiempo y momento de exposición y la propia genética del individuo. De este modo, bajo ciertas circunstancias, los estímulos de la respuesta innata, a través de sus efectos sobre las células dendríticas y reguladoras, pueden participar en el desarrollo o modulación de alergia y otras enfermedades.

Constantemente aparecen nuevos datos sobre la interacción de genes con factores medioambientales implicados en enfermedades alérgicas. Uno de los mayores retos es conseguir integrar con una visión global, la información molecular, clínica y epidemiológica para descubrir mecanismos robustos de interacción gen-medioambiente en este tipo de enfermedades complejas. Para ello es esencial analizar tanto las interacciones gen-gen (epistasia) y diversas variantes genéticas (número de copias de un gen, modificaciones en DNA no codificante, elementos *cis* y *trans* reguladores...) que afectan a la susceptibilidad, como la exposición medioambiental que podría alterar el perfil genético vía mutaciones o mecanismos epigenéticos (Figura 3).

Figura 3. Interacción medioambiente y genética



La exposición medioambiental es el detonante de la respuesta individual, basada en la susceptibilidad genética. Las características de la exposición y otros factores coexpresados, modifican la naturaleza de esta respuesta, así como, afectan a la susceptibilidad genética por medio de la epigenética. Los factores genéticos pueden interactuar mutuamente (epistasia), estando la expresión afectada por la epigenética. Los variados fenotipos que se observan en clínica se suelen incluir en un determinado síndrome, que constituye en diagnóstico final. Adaptado de Garantziotis, S., Schwartz, D.A., 2010.

1.2.3. Teoría de la higiene

En 1989 el epidemiólogo David Strachan propuso que una exposición reducida a agentes infecciosos podría provocar que un individuo tuviese tendencia a sufrir alergia (Strachan, D.P. y cols., 1989). Aunque no utilizó el término de “teoría de la higiene”, trataba de explicar porqué las enfermedades alérgicas se estaban convirtiendo en enfermedades prevalentes en los países industrializados. Estudios epidemiológicos posteriores indican que la distribución geográfica de las enfermedades alérgicas es la imagen inversa de la distribución de enfermedades infecciosas (Bach, J.F., 2002, Wallin, M.T. y cols., 2004, Yang, Z. y cols., 1998). El equilibrio Th_1/Th_2 fue la primera explicación del efecto protector de los agentes infecciosos para las enfermedades inmunológicas. Sugería que la falta de estimulación por microorganismos conduce a una menor producción de citocinas Th_1 por las células de la inmunidad innata, lo que provoca un incremento de la respuesta Th_2 y por tanto, un aumento de los desórdenes alérgicos. Muchos estudios *in vitro* muestran que los componentes microbianos de los adyuvantes sintéticos pueden actuar directamente en las células de la respuesta innata, células dendríticas o NK, aumentando la producción de IL-12, IFN- α e IFN- γ , desviando la respuesta Th_2 a Th_1 (Koski, G. y cols., 2004, Parronchi, P. y cols., 1999). *In vivo*, varios estudios demuestran que la estimulación con microorganismos o adyuvantes sintéticos disminuyen el riesgo de enfermedad alérgica promoviendo fenotipos Th_1 (Santeliz, J.V. y cols., 2002, Moingeon, P., 2012).

Sin embargo, el paradigma Th_1/Th_2 no explicaba el paralelismo en el aumento de prevalencia de enfermedades alérgicas y enfermedades autoinmunes (mediadas por Th_1)

(Cooper, G.S. y cols., 2009). Ni porqué, enfermedades provocadas por helmintos y parásitos (de tipo Th₂) también protegen frente a enfermedades alérgicas. Parece que algunos agentes infecciosos (sobre todo aquellos que han tenido una evolución conjunta con los humanos) son capaces de “proteger” frente a un amplio espectro de desórdenes relacionados con el sistema inmune. Estos hechos apuntaban a la existencia de un mecanismo modulador común entre enfermedades alérgicas y autoinmunes.

Actualmente, se ha reinterpretado esta hipótesis y se considera que el exceso de higiene y una menor exposición a microorganismos provocan una actividad reguladora disminuida o defectuosa, promoviendo una respuesta aumentada, tanto Th₂ como Th₁. Cada vez está más clara la implicación de las células reguladoras en este proceso (Wambre, E. y cols., 2012), por lo que la inducción de células Treg específicas se considera esencial en el tratamiento de estas enfermedades.

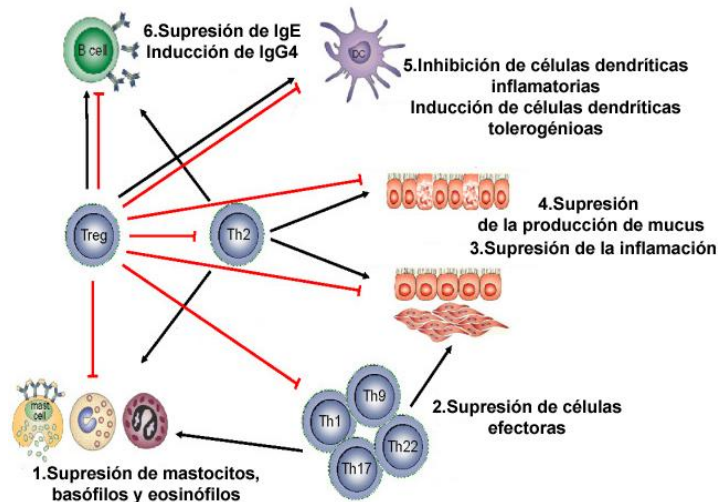
1.2.4. Células reguladoras en la enfermedad alérgica

El papel de las células reguladoras en la modulación de las enfermedades alérgicas es un área de gran interés. Las células Treg tienen el potencial de controlar y modificar el desarrollo de las enfermedades alérgicas a través de numerosos mecanismos (Figura 4). Promueven los tipos de células dendríticas con fenotipo tolerogénico (Wing, K. y cols., 2008) disminuyendo así su capacidad para potenciar las respuestas Th₁, Th₂ y Th₁₇. También pueden inhibir directamente la activación de las células Th₂ específicas de alérgeno, minimizando la producción de las citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-9 (Akdis, M. y cols., 2004a, Akdis, C.A. y cols., 1998, Jutel, M. y cols., 2003). Pueden tener efecto directo sobre las células B, suprimiendo la producción de anticuerpos IgE específicos e induciendo la formación de anticuerpos no inflamatorios (Meiler, F. y cols., 2008a).

Además, este tipo de células puede modular la inflamación alérgica a través de contacto directo con los mastocitos, basófilos y eosinófilos y las células residentes de los tejidos, impidiendo el remodelado tisular (Gri, G. y cols., 2008, Nonaka, M. y cols., 2008). También pueden bloquear el flujo de células T efectoras a los tejidos inflamados de modo dependiente de citocinas (Ring, S. y cols., 2006). Como mecanismo adicional, podrían impedir la inducción de células Th₀/Th₁, por disminución de la apoptosis de queratinocitos y células epiteliales bronquiales, previniendo así el daño tisular (Trautmann, A. y cols., 2000, Trautmann, A. y cols., 2002). Recientemente, se ha demostrado en un modelo murino que las células nTreg suprimen la inflamación pulmonar debida a células Th₁₇, además de regular la neutrofilia del pulmón, el reclutamiento de células B y los niveles de IgA polimérica e IgM en las vías aéreas (Jaffar, Z. y cols., 2009).

Para realizar estas funciones, las células Treg emplean una amplia variedad de factores supresores tanto anclados a la membrana como solubles, tales como IL-10, TGF-β, CTLA-4, PD-1 o HR2 (Akdis, M. y cols., 2004b, Meiler, F. y cols., 2008b, Sakaguchi, S. y cols., 2009).

Figura 4. Papel de las células reguladoras en las enfermedades alérgicas



Mecanismos de supresión, directos e indirectos, de las células Treg: 1. Supresión de mastocitos, basófilos y eosinófilos. 2. Supresión de células efectoras. 3. Supresión de la migración de células inflamatorias a los tejidos. 4. Supresión de la producción de mucus. 5. Inducción de células dendríticas tolerogénicas y supresión de las inflamatorias. 6. Supresión de la producción de IgE e inducción de IgG4. Líneas rojas: supresión, líneas negras: inducción. Adaptado de Fujita, H. y cols., 2012.

Aunque no hay evidencias directas entre alergia y defectos en la ruta de FOXP3, se ha descrito la asociación entre variantes polimórficas de un único nucleótido del gen FOXP3 y el desarrollo de alergia en la infancia (Bottema, R.W. y cols, 2010).

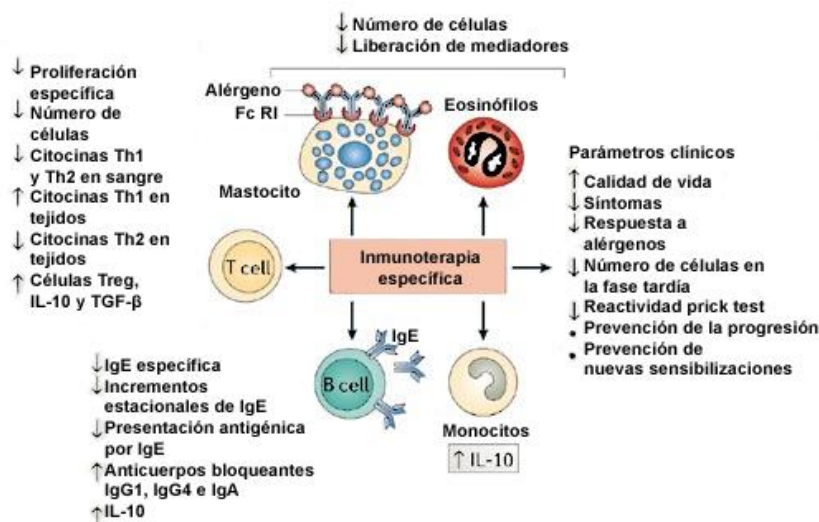
La evidencia experimental que indica que las células reguladoras tienen un papel fundamental en el control de la alergia (Fujita, H. y cols., 2012, Akdis, M. y cols., 2005, Jutel, M. y cols., 2003), junto a estudios epidemiológicos, ha llevado a nuevas interpretaciones de la “Teoría de la higiene”, como ya se ha comentado.

1.2.5. Tratamiento de las enfermedades alérgicas: inmunoterapia

La inmunoterapia específica (SIT) es el único tratamiento curativo para las enfermedades alérgicas. Este método, utilizado desde hace cien años como estrategia de desensibilización, tiene como objetivo final alcanzar un estado de tolerancia al alérgeno. La inmunoterapia clásica se basa en la administración al paciente de dosis crecientes del extracto alérgico frente al que se encuentra sensibilizado (Freeman, J., 1930; Bousquet, J. y cols., 1998). Aunque se desconoce el mecanismo exacto de acción, su utilización se mantiene debido a la disminución de los síntomas alérgicos en un elevado número de pacientes (Cappella, A., Durham, S.R., 2012). SIT habitualmente aumenta los niveles de anticuerpos IgG y presumiblemente, disminuye los de IgE, mediante una posible inhibición a través de la neutralización del antígeno por retroalimentación (un exceso de IgG podría bloquear los antígenos, impidiendo la estimulación de los receptores de los linfocitos B y su transformación a células plasmáticas). La desensibilización también podría inducir tolerancia específica de células T, mediante el cambio del fenotipo predominante de Th₂ a Th₁, u originar un aumento de Treg. Varias pruebas clínicas demuestran que la inmunoterapia induce Treg (Radulovic, S. y cols., 2008, Jutel, M. y cols., 2003, Nouri-Aria, K.T., 2004). Específicamente, en inmunoterapia para gramíneas con mejoría clínica, se ha descrito un aumento de Treg FOXP3⁺CD25⁺ en la mucosa nasal, apoyando el rol de las células Treg en la inducción

de la tolerancia (Radulovic, S. y cols., 2008). La Figura 5 muestra los posibles efectos de la inmunoterapia específica.

Figura 5. Efectos de la inmunoterapia específica (SIT)



La inmunoterapia específica (SIT) está asociada a una mejora de la tolerancia al alérgeno con un descenso de la inflamación alérgica, pudiendo prevenir el desarrollo de nuevas sensibilizaciones. SIT puede modificar la respuesta celular y humoral, cambiando la relación Th_1/Th_2 e induciendo células reguladoras, con secreción de las citocinas IL-10 y TGF-β que contribuyen a la función reguladora. También puede provocar el aumento de anticuerpos no inflamatorios IgA, IgG1 e IgG4 y reducir el número de mastocitos, eosinófilos y neutrófilos. Adaptado de Larché, M. y cols., 2006.

Este método ha sido muy eficaz para prevenir respuestas anafilácticas agudas frente al veneno de los insectos o fármacos (la penicilina), aunque en las enfermedades atópicas como la fiebre del heno, su eficacia es más variable.

2. Alergia al polen de olivo

2.1. Familia de las Oleáceas

La familia de las oleáceas (Oleaceae) engloba aproximadamente 800 especies, agrupadas en unos 24 géneros. La subfamilia de las *Oleideae* está constituida por un número relativamente escaso de especies, e incluye varios tipos de árboles y arbustos. En Europa, las más importantes son *Fraxinus* (fresno) y *Olea* (olivo y acebuche). Otras menos importantes son *Ligustrum* (aligustre), *Forsythia*, *Syringa* (lilas), *Jasminum* (jazmines) y *Phillyrea* (labiérnagos). En España sólo tres contribuyen de manera significativa a la carga atmosférica de pólenes: el fresno (Febrero-Marzo), el olivo (Abril-Junio) y el aligustre (Julio), aunque este último mínimamente, ya que es ornamental (Subiza, J. y cols., 1998).

2.2. Características de *Olea europaea*

El olivo (*Olea europaea*) es un árbol longevo, cultivado por el hombre durante más de 5.000 años para la explotación de su fruto, aceite y madera. Probablemente procede de Asia Menor, desde donde se extendió por toda el área mediterránea. En el siglo XVI se introdujo en el continente americano y en el siglo XVII, en áreas de climatología similar a la mediterránea, como Australia y el Sur de África (Manousis, T.

y cols., 1998). En Europa, se encuentra casi exclusivamente en la cuenca mediterránea, (Spieksma, F.T. y cols., 1993), mientras que otras oleáceas como *Fraxinus* y *Ligustrum* también están presentes en la Europa septentrional (Corsico, R., 1993). A pesar de su mayor distribución geográfica, la importancia alérgica de estas especies en la cuenca mediterránea es mucho menor que la de *Olea* (Bousquet, J. y cols., 1985).

Existen diversas especies de olivo, habiéndose catalogado en España más de 165 variedades, incluida la forma silvestre *Olea oleaster* (Barranco, D. y cols., 1984).

La polinización del olivo es entomófila, pudiendo ser anemófila si la producción de polen es abundante (D'Amato, G. y cols., 1988). El periodo de polinización oscila según la altitud y condiciones climáticas, de finales de Enero hasta Junio, aunque suele ser de Abril a finales de Junio, durando unos 40 días. La cantidad de polen varía según los factores climáticos anuales, estimándose en el área mediterránea una concentración media de 100-200 granos/m³ (D'Amato, G. y cols., 1994), con picos de hasta 4500 granos/m³ en zonas con grandes extensiones cultivadas, como Jaén en España o Abulia en Italia (Macchia, L. y cols., 1991).

2.3. Características de la polinosis por polen de olivo

El polen del olivo es una de las causas más importantes de alergia respiratoria en el área mediterránea (Bousquet, J. y cols., 1985). Se ha descrito ampliamente la alta prevalencia de síntomas nasales y conjuntivales inducidos por *Olea* (Liccardi, G. y cols., 1996a). Esta polinosis se caracteriza por una sintomatología nasal y/o bronquial, con severidad enormemente variable en función del área geográfica y la extensión cultivada (Bousquet, J. y cols., 1984, Gioulekas, D. y cols., 1991). Los pacientes con polinosis por polen de olivo suelen ser alérgicos también a otros pólenes, aunque hay ejemplos de monosensibilización en Nápoles, caracterizándose por una presencia de síntomas todo el año, sin un empeoramiento en la época de polinización (Liccardi, G. y cols., 1996b) y en España (Blanco, C. y cols., 1992, Carreira, J. y cols., 1995).

El umbral de polen requerido para mostrar síntomas alérgicos a este polen es extremadamente alto, unos 400 granos/m³, comparado con los 50 granos/m³ descritos para tener síntomas por las gramíneas (Davies, R.R. y cols., 1973, Florido, J.F. y cols., 1999). Además, se ha descrito que la severidad en los síntomas de los pacientes aumenta cuando están expuestos a altos niveles de polen, como ocurre en Jaén, donde las concentraciones de polen atmosférico varían entre 500 y 1.000 granos/m³, con picos de más de 5.000 granos/m³ a mediados de mayo (Florido, J.F. y cols., 1999). También hay evidencias que sugieren una respuesta IgE más compleja frente al polen de olivo en estos pacientes que la que se observa en pacientes de lugares con una exposición polínica más baja (Rodríguez, R. y cols., 2001).

En general, un paciente alérgico reacciona prioritariamente frente a determinados antígenos, bien porque sean más abundantes o porque presenten mayor capacidad sensibilizante. Se denominan alérgenos mayoritarios aquéllos frente a los cuales presentan anticuerpos IgE específicos más del 50% de los enfermos alérgicos y alérgenos minoritarios los reconocidos por menos del 50% de los pacientes alérgicos. En áreas con una amplia explotación de olivos, la alta carga polínica provoca, en lugar de rinoconjuntivitis (clínica mayoritaria asociada a la sensibilización por Ole e 1, alérgeno mayoritario de polen de olivo), una clínica más severa, mayoritariamente de asma (Florido, J.F. y cols., 1999), asociada a la sensibilización con alérgenos minoritarios en zonas de baja carga polínica, Ole e 2 y Ole e 10 (Quiralte, J. y cols., 2005). Estos alérgenos son mayoritarios en regiones de carga polínica muy alta.

Además se ha demostrado que estos alérgenos están restringidos por distintos antígenos de HLA de clase II que Ole e 1 (Quiralte, J. y cols., 2005).

Las principales áreas de incidencia de la polinosis por polen de olivo son el sur de Francia, España, Italia, algunas regiones de Portugal, Grecia e Israel (Wheeler, A.W., 1992). También se han descrito algunas zonas de América del Norte como California y Arizona (Vinay, P. y cols., 1986) y Australia (Baldo, B.A. y cols., 1992). En España, se distribuye preferentemente por la mitad sur, especialmente en Andalucía, aunque Madrid, Toledo, Teruel, Cáceres y Badajoz también poseen extensos olivares. El polen de olivo es considerado la segunda causa de polinosis en España (detrás de las gramíneas) y en determinadas zonas de Andalucía como Córdoba o Jaén, la primera.

El patrón de componentes alergénicos (alergograma) del polen de olivo es muy complejo, ya que contiene un elevado número de proteínas reconocidas por los anticuerpos IgE de los pacientes alérgicos a este polen. Los primeros estudios de caracterización de los alérgenos del polen de olivo describieron múltiples bandas proteicas (Vela, C. y cols., 1982, Blanca, M. y cols., 1983, Lahoz, C. y cols., 1985, Lauzurica, P. y cols., 1988a) destacando las de 17 y 19 kDa, reconocidas por el mayor número de sueros de pacientes alérgicos, 65% y 88% respectivamente (Wheeler, A.W. y cols., 1990), que se llamó antígeno Ole e 1 (Lauzurica, P. y cols., 1988b). Hasta la fecha, se ha demostrado la presencia de al menos 20 proteínas con actividad alergénica, de las cuales 13 han sido caracterizadas, de Ole e 1 a Ole e 13, según la nomenclatura de la IUIS (Internacional Union of Immunology Societies).

Ole e 1 es considerado el alérgeno mayoritario, ya que es el causante de más del 70% de las sensibilizaciones en pacientes. Es el alérgeno de polen de olivo más estudiado (De Cesare, F. y cols., 1993, Villalba, M. y cols., 1990, Fernández-Caldas, E. y cols., 2007, Palomares, O. y cols., 2006, Quiralte, J. y cols., 2000, Huecas, S. y cols., 1999, Batanero, E. y cols., 1999, Villalba, M. y cols., 1993) y se han definido epítomos B (Martín Orozco, E. y cols., 1994) y epítomos T (Cárdaba, B. y cols., 1998).

Además, se han descrito ejemplos de cómo la exposición a altas concentraciones de polen de olivo en un contexto genético determinado, puede ser clave para el desarrollo de distintos tipos de patologías alérgicas, así cómo, proteger de la sensibilización e inducir una respuesta moduladora (Geller-Bernstein, C. y cols., 1996, Geller-Bernstein, C. y cols., 2002, Cárdaba, B. y cols., 2007).

3. Genética de las enfermedades alérgicas

3.1. Aproximaciones clásicas para el estudio genético

Como ya se ha reiterado, las enfermedades alérgicas son enfermedades complejas, poligénicas multifactoriales. En décadas pasadas, se realizaron grandes esfuerzos para identificar factores asociados al riesgo o la protección frente a este tipo de patologías, estudiando genes y factores ambientales como elementos independientes.

Clásicamente, se han utilizado dos aproximaciones para la búsqueda de genes relacionados con la alergia: la búsqueda de nuevos genes o *loci* mediante estudios de ligamiento y el análisis de genes candidatos (estudios de asociación) (Ober, C. 2005, Cárdaba, B. y cols., 1993, Vercelli, D., 2008a, Holloway, J.W., 2010).

Los estudios de ligamiento tienen como objetivo la localización de regiones cromosómicas con genes de susceptibilidad para una enfermedad, para lo que se generan genotipos de marcadores microsatélites (secuencias de ADN de 2 a 6 pares de bases) de gran variabilidad. A pesar de la baja reproducibilidad de los resultados, por la falta de potencia estadística, diferencias en el diseño de estudio o diferencias genéticas

en las poblaciones analizadas, algunos cromosomas han demostrado un ligamiento constante, encontrándose genes relevantes, como el agrupamiento de citocinas situado en el cromosoma 5q, FcεRI-β en 11q, IFN-γ y STAT6 en 12q y IL4R-α en 16p.

En los estudios de asociación se suelen seleccionar genes candidatos a partir de vías biológicas “*a priori*” involucradas en la patogénesis (citocinas, receptores de éstas, sus factores de transcripción, receptores de IgE, etc), y a partir de ellos se buscan polimorfismos, normalmente de tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*). Los estudios de asociación investigan, a partir de sujetos no relacionados, qué frecuencias alélicas son diferentes en cada fenotipo. Una ventaja de este tipo de estudios frente a los de ligamiento es la identificación de pequeñas variaciones genéticas que tienen pequeños efectos en la susceptibilidad. La desventaja de estos estudios es la limitación a la hora de encontrar nuevos genes o que no estén directamente relacionados.

3.1.1. Genes asociados con las enfermedades alérgicas

A pesar de las limitaciones, las aproximaciones clásicas en la búsqueda de factores genéticos han permitido realizar importantes descubrimientos (Ober, C., 2005, Blumenthal, M.N., 2005). Los genes de susceptibilidad descritos hasta el momento podrían categorizarse basándose en sus funciones en cuatro grupos: genes de barreras defensivas, reconocimiento antigénico y presentación, regulación inmune y diferenciación y dianas del proceso alérgico (Meng, J.F., Rosenwasser, L.J., 2010).

Genes de Barreras defensivas: Las barreras oral, bronquial y epitelial están expuestas a los factores medioambientales, y por tanto, su integridad es crucial para el mantenimiento de su función protectora. Varios genes, entre los que destacan el de la filagrina (FLG) y el colágeno (COL29A), se han asociado con respuestas alérgicas: FLG forma parte del complejo epidermal, se expresa en la epidermis y la mucosa oral y nasal, pero no bronquial, y es esencial en la integridad de la piel. Mutaciones nulas de FLG se han asociado con un alto riesgo de tener dermatitis atópica y asma (Palmer, C.N. y cols., 2006, Sandilands, A. y cols., 2009, Marenholz, y cols., 2006). El colágeno COL29A se expresa mayoritariamente en la piel, pulmón y tracto gastrointestinal. La región 3q21 donde se localiza el gen COL29A se ha identificado como un *locus* de susceptibilidad para dermatitis atópica (Söderhäll, C. y cols., 2007).

Genes de reconocimiento y presentación: Tras atravesar la barrera defensiva, el reconocimiento y la presentación de los antígenos ambientales iniciará la respuesta innata y específica desencadenando la inflamación alérgica. Múltiples variantes génicas de receptores y ligandos, tanto de la inmunidad innata como de la específica, se han asociado con fenotipos alérgicos: el CD14 (Martínez, F.D., 2007) y los receptores *toll-like* (TLRs)(Kumar, H. y cols., 2009), receptores intracelulares como los NODs (dominios de oligomerización de unión a nucleótidos), receptores de alta (FcεRI) o de baja afinidad (FcεRII, CD23) para la IgE (Hizawa, N. y cols., 2000, Meng, J.F. y cols., 2007), el receptor de la prostaglandina (PTGER2), los genes HLA-DRB1 (Donfack, J. y cols., 2000) y el receptor de células T (TCR)(Moffatt, M.F. y cols., 1994).

Genes de inmunoregulación y diferenciación: La diferenciación hacia una respuesta Th₂ es un evento crucial en la reacción inflamatoria (Larché, M. y cols., 2003). Se han descrito asociaciones entre diferentes fenotipos atópicos y variantes génicas en muchos genes de la respuesta Th₂: GATA3, STAT6, IL4, IL4R, IL13, IL5, IL5R y PHF11, así como en genes relacionados con Th₁: IL12b, TPET, HLX1, IRF (Vercelli, D., 2008b).

Otros genes, cuyas fuentes celulares son variadas, también se han implicado en el desarrollo de la respuesta Th₂: TGFβ1, IL10, STAT3, CCL5, CCL1, CCL24 y DPP10 (Ober, C., Hoffjan, S., 2006, Vercelli, D., 2008b).

Genes de dianas del proceso alérgico: Los mediadores inflamatorios (quimiocinas, citocinas, leucotrienos...) contribuyen en gran medida en los procesos alérgicos. Algunos genes involucrados son: ADAM33 en el remodelado de los tejidos, GSTM1, GSTT1 y GSTP1 en la detoxificación y el estrés oxidativo (Minelli, C. y cols., 2010), NOS1 para la síntesis de óxido nítrico (Gao, P.S. y cols., 2000) y otros como LTC4 (Sayers, I. y cols., 2003), ADRB2 (Pinto, L.A. y cols., 2008), TNF (Sharma, S. y cols., 2006), GPRA (Laitinen, T. y cols., 2004), CCL11 y CCL5 (Lee, J.H. y cols., 2008).

Otro aspecto importante en el análisis genético es la interacción entre genes, ya que puede originar efectos sinérgicos que son diferentes a los efectos aditivos de cada uno de los genes. Un ejemplo de interacción gen-gen en alergia son los genes IL-13 e IL-4: su unión al receptor común (IL-4Rα) induce la polarización Th₂. Los individuos con un genotipo de riesgo para ambos genes tienen cinco veces más posibilidades de desarrollar asma que los individuos con esos genotipos por separado (Howard, T.D. y cols., 2002). Otro ejemplo se describió en la polinosis por olivo, donde la combinación de ciertos alelos del gen IL4RA se asociaba fuertemente con el fenotipo asmático mientras que por sí solos no presentaban asociación (Llanes, E. y cols., 2008).

El análisis de interacciones entre genes conocidos o desconocidos probablemente causará un gran impacto en los resultados de los estudios de asociación.

3.2. Nuevas tecnologías para el estudio genético de enfermedades

El avance tecnológico de los últimos años ha permitido abordar las enfermedades complejas desde una nueva perspectiva. El gran volumen de información que supuso el Proyecto Genoma Humano (IHGSC, *International Human Genome Sequencing Consortium*, 2004) facilitó el desarrollo de nuevas plataformas, entre las que destacan las basadas en *arrays*, tales como los GWAS (*Genome-wide association study*), que permiten estudiar de forma masiva los SNPs del genoma, o como los microarrays de expresión génica, para el estudio completo de expresión génica o transcriptómica. Otras tecnologías incluyen los arrays CGH (*Comparative Genomic Hybridization Arrays*, que permiten conocer cambios en el número de copias del DNA), los *arrays* de proteínas o los *arrays* de RNA de interferencia (analizan RNAs reguladores de la expresión).

3.2.1. Introducción a los microarrays de expresión génica

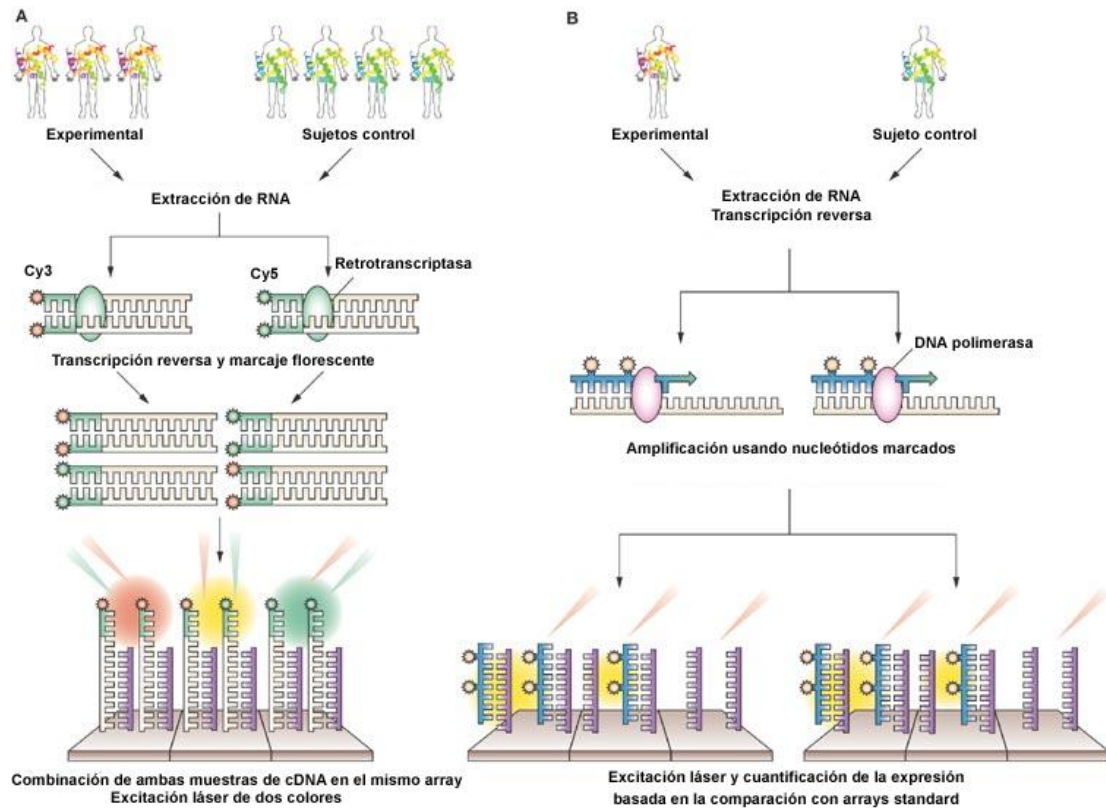
La aparición de la tecnología de microarrays de expresión génica a mediados de los años 90 y la caracterización del genoma humano han permitido el estudio de la expresión génica a gran escala en un solo experimento, convirtiéndose en una herramienta muy popular para determinar el transcriptoma de una célula (Rolph, M.S. y cols., 2006).

Los microarrays son pequeñas piezas de cristal o plástico en las que se depositan moléculas, normalmente DNA o proteínas, para el análisis por hibridación. Existen dos tipos principales de microarrays de expresión génica, dependiendo del tipo de sonda usada para detectar la expresión: cDNA (Figura 6A) u oligonucleótidos (Figura 6B).

Los microarrays de cDNA tienen sondas de moléculas de cDNA de entre 500 y 5.000 pares de bases. Se conocen como microarrays de dos colores porque miden la

expresión como la relación entre dos muestras marcadas con diferentes fluoróforos (por ejemplo Cy3 y Cy5) que compiten por hibridar las sondas.

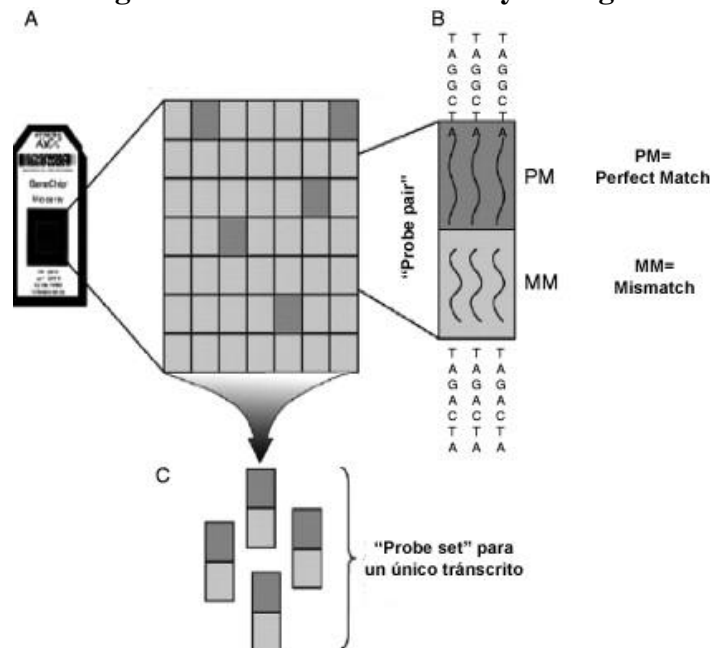
Figura 6. Tipos de microarrays: cDNA y oligonucleótidos



A) Arrays de cDNA: Utilizan dos sondas fluorescentes (Cy3 o Cy5) para marcar el cDNA de controles o muestras. El cDNA se mezcla y se hibrida conjuntamente, para después ser escaneado con dos longitudes de onda. Las imágenes se combinan con un software para detectar los genes diferenciales entre ambos tipos de muestras. B) Arrays de oligonucleótidos: el RNA se extrae, se transcribe a cDNA y se marca con biotina. Cada muestra se hibrida en un array que será escaneado y sus fluorescencias comparadas para determinar los niveles de expresión relativos. Adaptado de Walker, E.J., Siminovich, K.A., 2007.

El segundo tipo de microarrays tiene sondas de oligonucleótidos de longitud variable, típicamente entre 25 y 70 pares de bases. Estos chips (Figura 7) representan cada gen con 16-20 pares de oligonucleótidos llamados *Probe sets* (PS) (Lockhart, D.J. y cols., 1996). El primer componente de este par es el *perfect match* (PM), y está unido a otro oligonucleótido llamado *mismatch* (MM), que se fabrica cambiando la base central (la decimotercera) para medir la unión inespecífica. El conjunto de PM y MM se llama *Probe pair*. Las muestras de RNA se preparan, se marcan y se hibridan con el microarray. Después se escanean y las imágenes se analizan para obtener la intensidad de cada sonda. Estas intensidades representan la hibridación para cada par de oligonucleótidos. Es fundamental encontrar la forma de combinar las intensidades de esos 16-20 pares de oligonucleótidos para un gen dado y definir la medida de expresión.

Figura 7. Disección de un array de oligonucleótidos



A) El array lleva una pieza de cuarzo con más de un millón de secciones, cada una de ellas con millones de oligonucleótidos. B) Para cada PM (perfect match) se incluye un MM (mismatch) idéntico al anterior excepto por un nucleótido cambiado en la posición central. C) Las parejas PM y MM que hibridan a la misma secuencia se denominan "probe set". Adaptado de Maresso, K., Broeckel, U., 2008.

La tecnología de microarrays de expresión génica permite el análisis de expresión simultánea de todos los genes humanos conocidos, en muestras de distinta procedencia, lo que abre múltiples posibilidades como poder identificar nuevos mecanismos de una enfermedad, marcadores diagnósticos o candidatos terapéuticos.

Los perfiles de expresión génica pueden utilizarse para identificar nuevos genes candidatos, definir fenotipos o identificar redes de regulación (Baye, T.M. y cols., 2010). Array Express y Gene Expression Omnibus (GEO) son dos de las mayores bases públicas para datos experimentales de microarrays, con múltiples anotaciones que incluyen asociaciones a enfermedades. La integración de la información molecular y funcional es necesaria, por lo que la bioinformática es un área esencial para el avance en este campo. Por ejemplo, usando datos de expresión disponibles públicamente, se ha descrito un mapa funcional y regulador del asma (Novershtern, N. y cols., 2008).

En resumen, los microarrays han abierto un campo de estudio real hacia la medicina personalizada, en el que se puede diseñar el análisis de múltiples factores hasta ahora difícilmente explorables de forma simultánea, que teóricamente permiten no sólo confirmar vías de la patología ya conocidas, sino también y más importante, explorar nuevas posibilidades tanto a nivel diagnóstico como terapéutico, como ya es posible en otras enfermedades.

3.2.1.1. Microarrays y su utilización en la enfermedad alérgica

Los microarrays son útiles herramientas con múltiples utilidades: permiten, por ejemplo, comparar la expresión génica diferencial entre controles y pacientes, antes o después de un tratamiento, con el objetivo de encontrar nuevos genes y mecanismos que definan firmas moleculares útiles en el diagnóstico o la clasificación de la enfermedad, así como, tratamientos específicos. Aunque esta tecnología se ha utilizado

mayoritariamente en la investigación frente al cáncer, puede ser muy útil en otras enfermedades complejas. De hecho, a pesar de no haber sido aún muy utilizada en el área de las enfermedades alérgicas (una búsqueda basada en la palabra “microarray” indica que menos del 1.5% son de alergia y la mayoría de los últimos años) actualmente se considera de gran utilidad para encontrar nuevas vías de actuación, como lo demuestran trabajos muy recientes (Chamberland, A. y cols., 2009, Benson, M. y cols., 2009, Jones, S.M. y cols., 2009, Dorsam, G.P. y cols., 2010, Bruhn, S. y cols., 2012). La primera revisión de microarrays en enfermedades alérgicas (Benson, M. y cols., 2004), describía cómo algunos trabajos pioneros identificaron una combinación de genes que discriminaba de manera más certera entre asmáticos y controles sanos que los niveles de IgE (Brutsche, M.H. y cols., 2002). Destacaban además la posibilidad de identificar grupos de genes funcionalmente relacionados, en vez de genes individuales.

Posteriormente, avances muy interesantes en las enfermedades alérgicas se han asociado con estudios que han utilizado microarrays (Cárdaba, B. y cols., 2012). Destacan tres tipos principales de avances: primero, el descubrimiento y verificación de genes diferencialmente expresados con la descripción de múltiples biomarcadores potenciales o dianas terapéuticas que están siendo validadas (Hansel, N.N. y cols., 2008, Sääf, A.M. y cols., 2008, Izuhara, K., Saito, H., 2006, Schreffer, W. y cols., 2005, Tyner, J.W. y cols., 2006, Woodruff, P.G. y cols., 2007, Jones, S.M. y cols., 2009). Segundo, la posibilidad de encontrar patrones moleculares asociados a fenotipos clínicos, como ha sido demostrado en asma, donde al menos dos tipos de fenotipos definidos por el grado de inflamación Th₂ han sido descritos (Woodruff, P.G. y cols., 2009). Tercero, la posibilidad de encontrar rutas desreguladas mediante el análisis de módulos que involucran genes que interactúan entre sí, normalmente relacionados funcionalmente. Esta aproximación identificó el papel inhibitorio de IL7R en la inflamación alérgica (Mobini, R. y cols., 2009).

3.2.2. Microarrays de Affymetrix

Existen múltiples plataformas comerciales de microarrays pero en este estudio se emplearon chips de Affymetrix, cuyas sondas se diseñan utilizando información disponible públicamente en GenBank, dbEST y RefSeq. Los pares de sondas tienen diferentes sufijos para describir su habilidad para unirse a diferentes genes o variantes:

- “_at” significa que la sonda sólo hibrida con un único gen.
- “_a_at” significa que la sonda reconoce transcritos múltiples del mismo gen.
- “_s_at” significa que la sonda reconoce múltiples transcritos de genes diferentes. El 90% de estas sondas representan variaciones de *splicing*.
- “_x_at” significa que no ha sido posible seleccionar una única sonda o conjunto de sondas para los diferentes transcritos múltiples. Estas sondas hibridan de manera impredecible, ya que comparten secuencias idénticas para las variantes.

Una vez que la muestra se escanea, se genera un archivo “.dat”. El *software* calcula los datos de intensidad (*cell intensity data* o archivos “.cel”) a partir del archivo de imagen. Este archivo contiene un único valor de intensidad para cada sonda. La luz emitida a 570 nm por el chip es proporcional a la cantidad de RNA unida a cada sonda. Cada punto corresponde a una sonda individual (PM o MM). Las sondas de cada gen se distribuyen aleatoriamente a lo largo del chip para anular cualquier efecto región.

3.2.3. Análisis de datos de microarrays

Del archivo “.cel” habrá que obtener la información sobre la expresión génica de la muestra. Para ello, son necesarios tres pasos a partir de los datos primarios:

- Corrección del *Background*.
- Normalización: Es un paso esencial en el análisis de datos. Normalizar es ajustar los datos del microarray para eliminar variaciones que aparecen debido a la tecnología o a la manipulación, en lugar de por diferencias biológicas.
- Valor global para cada transcrito (o gen): Como existen varias sondas que miden su intensidad (*probeset*), es necesario determinar la intensidad media del transcrito a partir de la intensidad de las sondas.

Los algoritmos más utilizados por Affymetrix para estos pasos son: MAS5 (Pepper, S.D. y cols., 2007), RMA (Irizarry, R.A. y cols., 2003) y dChip (Li, C., Hung Wong, W., 2001).

MAS5 es un algoritmo desarrollado por Affymetrix, que usa un chip de referencia (*baseline*) para normalizar los chips experimentales. La intensidad de cada sonda se ajusta frente a la correspondiente sonda del chip de referencia.

RMA usa un método por cuantiles a nivel de sonda, que hace que los chips tengan una distribución de intensidad idéntica.

dChip es un *software* que permite analizar a nivel de sonda con múltiples *arrays* mediante promedios de información. El *software* normaliza creando, por métodos iterativos, un “grupo invariante” de sondas que corresponden a genes no diferenciales.

Tras utilizar estos algoritmos se obtiene un archivo CHP que aporta:

- Lista de sondas (transcritos).
- Número de *Probe pairs* que hibridan a cada gen.
- Número de *Probe pairs* utilizados para calcular la señal.
- Señal: *Raw Adjusted Intensity*.
- Presencia o ausencia de transcritos.
- *P-value* utilizado para determinar la presencia o ausencia de los genes.

El siguiente paso suele ser el análisis de genes relacionados funcionalmente, que aporta la ventaja de encontrar una posible mayor relevancia biológica. El análisis de *cluster* es un método común para identificar genes coexpresados. Otro método para identificar patrones de expresión génica es el análisis de componente principal (PCA), en el que las relaciones entre diferentes variables pueden ser descritas en modelos de diseño gráfico. Este método junto con el uso de “*neural networks*” se ha utilizado para la clasificación clínica de tumores (Khan, J. y cols., 2001). Otra opción para identificar genes funcionalmente relacionados consiste en organizar los genes diferenciales en grupos funcionales basados en información de bases de datos públicas como “Entrez” o mediante *software* especializados (ej: DAVID, FatiGO, GoMiner).

3.2.3.1. Análisis de Componentes Principales (PCA)

El análisis de componentes principales (PCA) es un método que reduce los datos multidimensionales a menos dimensiones para facilitar el análisis y su visualización. PCA se define matemáticamente como la transformación lineal ortogonal que transforma los datos a un nuevo sistema de coordenadas de modo que la mayor varianza de cualquier proyección de los datos acabe en la primera coordenada (llamada el primer componente principal), la segunda mayor varianza en la segunda coordenada y así

sucesivamente. PCA puede usarse para reducir las dimensiones de los datos al mismo tiempo que se retienen las características que más contribuyen a su varianza. PCA es muy útil para identificar los patrones más significativos de los datos de microarrays.

3.2.3.2. *Clustering* de genes obtenidos mediante microarrays

Se denomina *clustering* al agrupamiento de objetos basándose en su similitud. La similitud se define antes de realizar el *clustering*. Esta técnica es muy común en el tratamiento estadístico de los datos de microarray y tiene múltiples aplicaciones. La mayoría de las técnicas de *clustering* usan la distancia métrica para definir la similitud o diferencia entre dos objetos. Algunas de las distancias métricas más utilizadas son la distancia Euclídea, Manhattan o la de Correlación.

La representación de estos *clustering* es un árbol, conocido como dendograma, con los elementos individuales en un extremo y un único *cluster* con todos los elementos en el otro. La longitud de las ramas corresponde al grado de similitud entre los genes (Benson, M. y cols., 2004) y las familias de genes corregulados suelen aparecer juntos. El *clustering* ayuda a identificar genes con una función similar.

Esta técnica es muy útil para identificar patrones, como perfiles de expresión génica que agrupan elementos en clases con relevancia clínica, algo que se utiliza en la clasificación de determinados tumores (Sørlie, T. y cols., 2001) o en la búsqueda de marcadores de riesgo (Khan, J. y cols., 2001, Ramaswamy, S. y cols., 2001). En las enfermedades alérgicas, aunque incipiente, existen algunos trabajos en este sentido, como un *array* que evalúa la expresión de 10 genes desregulados en individuos atópicos asmáticos (Brutsche, M.H. y cols., 2002). Este tipo de estudios pueden facilitar en el futuro el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades alérgicas.

3.3. Genómica funcional

La interpretación de los datos a escala genómica suele realizarse en dos pasos: la selección de los genes de interés (aquellos que se coexpresan en un *cluster* que está significativamente desregulado al comparar dos *sets* de experimentos) y después, se compara el enriquecimiento de cualquier tipo de información biológica relevante de esos genes frente al *background* (el resto de genes del genoma o los del experimento). Hay varias herramientas disponibles para realizarlo, como FatiGO (Al-Shahrour, F. y cols., 2004) que utiliza etiquetas funcionalmente relevantes como los Gene Ontology (GO) *terms* (Ashburner, M. y cols., 2000), KEGG (Kanehisa et al, 2004), etc.

GO organiza los términos funcionales en tres categorías: Función molecular, procesos biológicos y componentes celulares. Una desventaja de estos términos es que no corresponden directamente a rutas conocidas (Mao, X. y cols., 2005).

La base de datos KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) forma parte del proyecto GenomeNet de la Universidad de Kyoto. Esta base agrupa los genes en rutas metabólicas o reguladoras, facilitando situar los genes en un contexto funcional.

DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) es otra base con múltiples herramientas para la anotación y clasificación de grandes cantidades de genes, que incluye anotaciones funcionales.

Otra herramienta útil es STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*), base de datos sobre interacciones proteína-proteína. Las interacciones pueden ser directas (físicas) o indirectas (funcionales) y la información deriva de diversas fuentes. Los resultados que ofrece incluyen una lista de asociaciones potenciales entre proteínas y el método de predicción utilizado en cada caso.

Todas estas herramientas permiten obtener una visión más global de la patología a estudiar, además de abrir nuevas vías que, de no analizarse con este tipo de aproximaciones, difícilmente se obtendrían.

Finalmente, un punto muy importante cuando se analizan grandes bases de datos es, el prestar atención a las asociaciones aleatorias (Ge, H. y cols., 2003). Llevar a cabo múltiples test es un problema complejo. Para controlar la proporción de errores entre los términos GO identificados, cuyas diferencias entre los grupos de genes no puedan ser atribuidas al azar, se obtiene el FDR (*False Discovery Rate*) o proporción de falsos positivos (Benjamini Y, Hochberg Y, 1995). Hay varios procedimientos para controlar el FDR (Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995, Westfall, P.H., Young, S.S., 1993).

3.4. Genómica y direcciones futuras

El avance en el conocimiento del genoma y el gran desarrollo tecnológico ocurrido con los microarrays ha permitido estudiar los componentes moleculares que constituyen la base de las enfermedades, generando el término “medicina genómica”. Estos estudios a gran escala no sólo proporcionan valiosa información sobre la patofisiología de la enfermedad, sino que además informan sobre la “arquitectura genética” de enfermedades complejas, con múltiples utilidades.

Los resultados de estas aproximaciones pueden facilitar estrategias preventivas o tratamientos personalizados en sujetos pre-sintomáticos, como ya existen (test de susceptibilidad) para algunas enfermedades comunes ([www. Decodediagnostics.com](http://www.Decodediagnostics.com)).

Otra importante utilidad es la farmacogenética o búsqueda de diferencias individuales en la respuesta a un fármaco. Esta aproximación permite pensar en terapias individualizadas según el genotipo, y por tanto, especialmente útil para enfermedades clínicamente heterogéneas, como las enfermedades alérgicas.

La farmacogenómica o descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos utilizando herramientas genómicas a gran escala, también será esencial en el futuro desarrollo farmacológico. Ya han sido identificados muchos genes de los que se conoce su función, pero otros muchos suponen un reto por descubrir.

Otros aspectos fundamentales y complementarios como el análisis de la epigenética o epigenómica, la búsqueda de la influencia medioambiental y las interacciones gen-ambiente, pueden verse beneficiadas por estas tecnologías.

Finalmente, estas aproximaciones podrán revolucionar la clasificación de las enfermedades, pasando de la clasificación sintomática, a clasificar las enfermedades en base al conocimiento de los mecanismos moleculares subyacentes y su pronóstico. De modo paralelo, el tratamiento se convertirá en individualizado, ajustándose a la respuesta individual en función del componente genético.

En resumen, los avances en genómica ya son una realidad, aunque quedan algunos años para que su uso se extienda en la práctica clínica. La investigación actual es el principio de un cambio de concepto de la enfermedad que tendrá grandes repercusiones en la medicina del futuro.

OBJETIVOS

Las enfermedades alérgicas son procesos complejos y multifactoriales, en los que intervienen factores ambientales y genéticos, fundamentales tanto para la aparición como para el desarrollo de la enfermedad. El avance biotecnológico de los últimos años y la aparición de técnicas de estudio masivo han abierto nuevas perspectivas de estudio para incrementar el conocimiento de enfermedades complejas como es la alergia.

Por otro lado, a pesar de que se han descrito múltiples y diferentes mecanismos que pueden modular la sensibilización y la tolerancia a un determinado alérgeno, aún se desconocen las claves de porqué la exposición frente a antígenos ambientales comunes induce enfermedad alérgica en algunos sujetos.

Por ello, el objetivo principal de este estudio es definir biomarcadores y/o posibles dianas terapéuticas, que nos ayuden a mejorar el diagnóstico, pronóstico y/o el tratamiento, implicados en la aparición o no de la enfermedad, mediante el análisis genético masivo (microarrays de expresión génica), de una población compuesta por grupos bien definidos clínicamente frente a la respuesta al polen de olivo.

Para lograr este objetivo global se analizaron diferentes mecanismos moleculares en una población, agrupada en cinco grupos clínicos de sujetos expuestos a la misma carga antigénica ambiental, en dos momentos de exposición polínica (alta y baja concentración de polen), planteándose los siguientes objetivos concretos:

1) Caracterización de parámetros inmunológicos de los sujetos de estudio:

- Mediante la definición de perfiles séricos diferenciales de la respuesta humoral específica frente al polen de olivo, analizando los niveles medios en el suero, de anticuerpos IgE, IgG4 e IgA en los distintos grupos clínicos.
- Mediante la caracterización del perfil de respuesta celular de los sujetos de estudio, analizando los niveles medios de citocinas solubles en suero, representativas de respuestas Th₁, Th₂, Th₁₇ y T reguladoras, así como, la expresión génica de un factor intranuclear, FOXP3, como marcador específico de respuesta reguladora.

2) Caracterización de perfiles de expresión génica diferencial entre los grupos clínicos:

- Mediante el análisis comparativo de la expresión génica masiva por análisis de microarrays, de los distintos grupos clínicos, durante dos momentos de exposición alérgica (alta y baja concentración de polen de olivo).
- Mediante la validación de las vías/genes diferenciales obtenidos a partir de los datos de expresión génica inicial, con otra técnica experimental, qRT-PCR, en una población mayor, con el fin de definir biomarcadores de la enfermedad y/o posibles dianas terapéuticas.

MATERIALES

Y MÉTODOS

1. Diseño y sujetos de estudio

El estudio es un diseño tipo casos-controles, utilizando 4 tipos de controles diferentes en función de la clínica asociada.

La población total de estudio estuvo compuesta por 84 sujetos distribuidos en cinco grupos clínicos:

- Sujetos no alérgicos: n=17.
- Sujetos asintomáticos: n=10.
- Sujetos alérgicos no relacionados al polen de olivo: n=20.
- Sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento: n=22.
- Sujetos alérgicos al polen de olivo tratados con inmunoterapia específica: n=15.

Estos sujetos fueron diagnosticados y reclutados en el Departamento de Alergia de cuatro hospitales de Andalucía:

- Hospital Universitario San Cecilio de Granada (Dr. Fernando Florido).
- Hospital General de Especialidades de Jaén (Dr. Joaquín Quiralte).
- Hospital Policlínico de Sevilla (Dr. Julio Delgado)
- Hospital Civil de Málaga (Dr. Alfonso Miranda).

1.1. Variables y recogida de muestras

Durante el proceso de selección se establecieron una serie de criterios para la exclusión en el estudio, que fueron los siguientes: no tener el rango de edad adecuado (10-70 años), haber residido menos de 10 años en la zona de exposición al antígeno, ser fumador y llevar un tratamiento con corticoides o antihistamínicos que puedan alterar los parámetros a determinar.

Tras la exploración clínica y el consentimiento informado, a todos los sujetos se les realizaron pruebas cutáneas con una batería de alérgenos comunes (detallados en el apartado 1.2) y se extrajeron 3 alícuotas de sangre, que se enviaron en el menor tiempo posible (a temperatura ambiente) junto con los informes, al Departamento de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz para su procesamiento:

- Una alícuota de 5 ml de sangre completa sin anti-coagulante para la obtención del suero.
- Dos alícuotas de 10 ml de sangre completa con heparina para la obtención de células mononucleares de sangre periférica o PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*), plasma, ADN y ARN.

Este protocolo de extracción a los sujetos se realizó en dos condiciones diferentes de exposición polínica para analizar su posible efecto: de Abril a Junio (polinización, alta cantidad de polen) y de Octubre a Diciembre del 2006 (fuera del periodo de polinización, baja cantidad de polen).

1.2. Pruebas cutáneas

A todos los sujetos se les realizó un test cutáneo para polen de olivo con extracto completo de *O. europaea* (ALK Abelló) y frente a una batería de alérgenos que incluían *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Blattella germanica*, epitelio de perro y gato, *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium herbarum*, *Lolium perenne*, *Cynodon dactylon*, *Cupressus sempervirens*, *Platanus acerifolia*, *Artemisia vulgaris*,

Chenopodium album, *Salsola kali* y *Parietaria judaica* (Abelló, Madrid), siguiendo las recomendaciones de la EAACI (*European Academy of Allergy and Clinical Immunology*) (EAACI, 1989).

Se realizaron por la técnica del *Prick test*, aplicando las muestras sobre la superficie volar de ambos antebrazos y utilizando como control negativo una solución de suero fisiológico y como control positivo histamina. Se valoraron como positivas las pápulas de diámetro superior a 3 mm con respecto al control negativo, siendo las unidades expresadas en mm.

1.3. Grupos de estudio

Las características clínicas y demográficas de los individuos de estudio se resumen en la Tabla 9 del apartado 1 de Resultados.

- **SUJETOS NO ALÉRGICOS**

Los sujetos no alérgicos son individuos sanos, que presentaron resultados negativos en las pruebas cutáneas frente a la batería de alérgenos descrita, sin historial de asma ni enfermedades alérgicas ni respiratorias.

- **SUJETOS ASINTOMÁTICOS**

Los sujetos asintomáticos tenían sensibilización al polen de olivo, ya que presentaron el test cutáneo positivo a extracto de polen de olivo, pero no presentaban sintomatología alérgica (rinitis, asma).

- **SUJETOS ALÉRGICOS NO RELACIONADOS AL POLEN DEL OLIVO**

Estos sujetos fueron alérgicos en su mayor parte a medicamentos, algunos presentaban reacciones a picaduras de insecto, alergia a ácaros y epitelios de animales (perro y gato), pero no presentaron respuesta al polen de olivo.

- **SUJETOS ALÉRGICOS AL POLEN DE OLIVO SIN TRATAMIENTO**

Los individuos alérgicos al polen de olivo referían rinitis estacional y/o asma durante la exposición al antígeno (de Abril a Junio), test cutáneo positivo para el extracto de *O. europaea* y nunca habían sido tratados para esta sintomatología. Podían presentar test cutáneo positivo a otros aeroalérgenos.

- **SUJETOS ALÉRGICOS AL POLEN DE OLIVO CON TRATAMIENTO**

Estos pacientes alérgicos al olivo recibieron un tratamiento de inmunoterapia subcutánea para el polen de *O. europaea* con extractos estandarizados (ALK- Abelló, Madrid, CBF-Leti, Barcelona, Bial-Aristegui, Bilbao). La mayor concentración del alérgeno mayoritario (Ole e 1) corresponde a 10-15 µg. El tratamiento fue continuado al menos durante dos años antes de ser seleccionados para el estudio. Protocolos estándar fueron usados en el caso de reacciones severas (EAACI, 1989).

2. Procesamiento de las muestras

2.1. Obtención de suero

La muestra de sangre sin anticoagulante se centrifugó durante 10 minutos a 2.100 g en una centrífuga *Allegra X-15R* (Beckman Coulter, Brea, California, Estados Unidos) con el fin de obtener el sobrenadante, que es el suero.

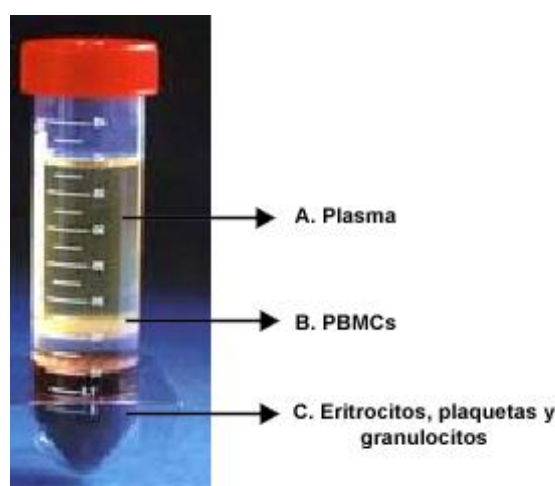
El suero se distribuye en alícuotas de 1,5 ml para ser almacenado a -80 °C.

2.2. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs)

Todo el proceso de aislamiento se lleva a cabo en condiciones estériles, en una campana de flujo laminar.

La purificación se realiza a partir de sangre periférica completa, extraída en un tubo estéril con heparina como anticoagulante. Se mezcla con un volumen igual de suero salino isotónico al 0,9% en un tubo estéril. Posteriormente, se realiza un gradiente de densidad con una solución de aislamiento de linfocitos (Linfoprep, Comercial Rafer, Zaragoza, España) siguiendo una proporción 3:5 de sangre diluida y solución de aislamiento. Se centrifuga a 460 g durante 20 minutos sin freno en una centrífuga *Allegra X-15R* (Beckman Coulter). Este proceso nos permite obtener distintas fases bien diferenciadas (Figura 8).

Figura 8. Fraccionamiento de sangre completa por gradiente de densidad



En la parte superior se obtiene el plasma. En la parte central, formando un anillo blanquecino, se obtienen las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*). En el sedimento inferior se sitúan las células de la serie roja (eritrocitos, plaquetas) y granulocitos.

Primero, se recoge el plasma y se almacena en alícuotas de 2ml a -80°C. Posteriormente, se recoge la franja que comprende las células mononucleares y se lavan con 40-50ml de suero salino isotónico al 0,9% dos veces, centrifugando a 675 g durante 10 minutos en una centrífuga *Allegra X-15R* (Beckman Coulter).

Las PBMCs purificadas se cuentan, utilizando una cámara de recuento celular o de Neubauer, en un microscopio óptico *Labophot* (Nikon, Tokyo, Japón) con un aumento de 40x.

Además, para observar la mortalidad e integridad de la membrana celular se mezclan 10 µl de las células en suspensión con 10 µl del colorante Azul tripán 0.4% (Gibco, Carlsbad, California, Estados Unidos) (dilución 1:1), aplicándose 10 µl en una cámara de Neubauer (contiene cuatro cuadrantes de 16 cuadrados cada uno). Se cuentan las células viables (brillantes, refringentes, no coloreadas) contenidas en los cuadrados de dos cuadrantes. Las células con la membrana alterada mostrarán coloración azulada. Se calculan las células por mililitro de suspensión y después se multiplica por el volumen inicial de la suspensión para calcular el número total de células:

Volumen de 1 cuadrante de 16 cuadrados= $0,1 \text{ mm}^3$

Número de células en dos cuadrantes x 10^4 = células/ml

Células/ml x Volumen total = Número total de células

La viabilidad se calcula de la siguiente manera:

Viabilidad (%)= $100 \times \text{células no coloreadas} / (\text{células no coloreadas} + \text{células azules})$

Las células aisladas son resuspendidas en una solución de congelación que contiene RPMI 1640 (Lonza, Verviers, Bélgica), 10% de suero de ternera fetal (Lonza) inactivado (30 minutos a 56°C) y dimetilsulfóxido al 10% (DMSO, Sigma-Aldrich, MO, Estados Unidos) a una concentración de $5-10 \cdot 10^6$ células/ml en viales de criocongelación de 1,5 ml (Sterilin, Cambridge, UK). Las células se mantienen un mínimo de 24 horas a -80°C y posteriormente se guardan a -196°C en Nitrógeno líquido, hasta su utilización.

2.3. Obtención de DNA

La obtención de DNA genómico se realizó con el kit EZ1 DNA *Blood* 350 μl (Qiagen, Hilden, Alemania) a partir de 350 μl de sangre completa en un *BioRobot* EZ1 (Qiagen), que utiliza partículas magnéticas para la purificación y lleva todos los reactivos necesarios. El DNA purificado es diluido en buffer de resuspensión del kit (200 μl) y tras eliminar con un imán las partículas magnéticas, se cuantifica.

2.4. Cuantificación de DNA o RNA

Para medir la concentración y pureza del DNA o RNA extraído, se utilizó un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Biosai Technologies Group, Madrid, España).

El protocolo utilizado es el aconsejado por la casa comercial. El *software* usado fue el Nanodrop 3.0.1. Antes del encendido, se coloca una gota de 2 μl de agua libre de ribonucleasas en el pedestal del lector, y se inicia el *software*, que automáticamente realizará una limpieza de la microcubeta y una medida del *background*.

Brevemente, en primer lugar se selecciona el programa de ácidos nucleicos y el tipo de medida a realizar (DNA o RNA). Se seca el pedestal y se coloca otra gota de 2 μl de agua libre de ribonucleasas (o el tampón en el cual esté diluida la muestra) para realizar el blanco. Se vuelve a secar el pedestal, se colocan 2 μl de la muestra de ácido nucleico a cuantificar y se realiza la medida. Debe aparecer un pico de absorción a 260 nm y un ratio entre las absorbancias 260 nm/280 nm próximo a 2.

Este espectrofotómetro requiere, para su correcta utilización, estar libre de contaminaciones, por ello, es aconsejable colocar una gota de 2 μl de agua libre de ribonucleasas en el pedestal del lector tras la última medición.

La presencia de picos a 280 nm indica presencia de contaminación proteica o fenol, lo cual afecta al ratio 260/280, al igual que la degradación del ácido nucleico. Otros contaminantes absorben a 230 nm (EDTA, carbohidratos, fenol) y por ello el ratio 260 nm/230 nm es también importante, considerándose que debe estar entre 2-2,2.

3. Respuesta humoral

3.1. Cuantificación de IgE total y de IgE, IgA e IgG4 específicos de *Olea europaea* en suero

Los niveles en suero de IgE total fueron determinados mediante inmunoensayo enzimático comercial CAP IgE (Phadia, Uppsala, Suecia) empleando el autoanalizador ImmunoCAP 250 (Phadia) y los anticuerpos específicos de *Olea europaea* IgE, IgA e IgG4 se determinaron por UNI-CAP (Phadia).

Los resultados se expresan en Unidades Internacionales por mililitro (UI/ml) para IgE total, en KAU/l (Kilo unidades arbitrarias por litro) para IgE específica y mgA/l (mg arbitrarios por litro) para IgG4 e IgA específicas, por comparación con los valores obtenidos con curvas patrones, realizadas con concentraciones conocidas que proporciona el fabricante.

4. Medida de citocinas solubles en suero

Se utilizaron enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) para determinar los niveles de IL-4, IL-5, IL-13, TNF- α , IL-10 (Diacclone, Besançon, Francia), IL-17, IFN- γ (eBioscience, San Diego, CA, USA), TGF- β (Beckton Dickinson, San Diego, CA, Estados Unidos) e IL-9 (Peprotech, Rocky Hill, Nueva Jersey, Estados Unidos). El análisis de estas citocinas se realizó en el suero de los sujetos de estudio.

Los rangos de detección de los kits de ELISA fueron los siguientes:

IL-4 (Diacclone)	1,1 pg/ml-35 pg/ml
IL-5 (Diacclone)	7,8 pg/ml-250 pg/ml
IL-13 (Diacclone)	3,12 pg/ml-100 pg/ml
TNF- α (Diacclone)	25 pg/ml-800 pg/ml
IL-10 (Diacclone)	1,56 pg/ml-50 pg/ml
IL-9 (Peprotech)	50-3000 pg/ml
TGF- β (Beckton Dickinson)	62,5-4000 pg/ml
IFN- γ (eBiosciences)	4-500 pg/ml
IL-17 (eBiosciences)	500 pg/ml-4 pg/ml

El protocolo de los ELISA de la casa comercial de Diacclone consiste en un primer paso de tapizado de una placa de 96 pocillos con 100 μ l del anticuerpo de captura. Esta placa se incuba durante toda la noche a 4°C.

Después de la incubación, la placa se lava dos veces con tampón fosfato salino o PBS (135 mM NaCl, 10 mM Fosfato, 2,7 mM KCl y pH 7,4) con 0,05% de detergente *Tween* 20 (PBS-*Tween*) y se añaden 250 μ l de tampón de saturación (PBS, 5% BSA peso/volumen) para bloquear uniones inespecíficas durante dos horas a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, se lava varias veces la placa con *buffer* de lavado (PBS, 0,05 % *Tween* 20 v/v).

Por otro lado, hay que preparar la dilución de los patrones correspondientes a cada kit según el rango de detección, en *Standard Diluent Buffer* (PBS, 1% BSA peso/volumen) y dispensar 100 μ l por pocillo junto con el control negativo, que no llevará nada excepto el diluyente. A continuación se dispensan también 100 μ l de las muestras de suero de los sujetos de estudio. Tanto los patrones como las muestras se analizan al menos por duplicado. Se mantiene la placa en incubación 2 horas a

temperatura ambiente, tras las cuales se lava tres veces con PBS-*Tween* y se añaden 50 µl del anticuerpo de detección biotinilado que corresponda (anti IL-4, anti IL-5...). Este anticuerpo se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se lava la placa 3 veces con PBS-*Tween*.

Se prepara una dilución 1:100 de HRP-Streptavidina en HRP-*Streptavidin Diluent Buffer* (PBS, 0,1% *Tween* 20, 1% BSA w/v) y de esta mezcla se hace una dilución de 150 µl/ 10 ml de HRP-*Streptavidin Diluent Buffer*, de la que se añaden 100 µl en cada pocillo, dejándose en incubación 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lava tres veces con PBS-*Tween* y se añaden 100 µl de 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) por pocillo, dejando desarrollar el color durante 10-15 minutos en oscuridad. La reacción se para añadiendo 100 µl de H₂SO₄ 1M. La absorbancia se mide a 450 nm con un filtro de referencia a 630 nm o a 650 nm.

Este protocolo de ELISA es muy similar en las distintas casas comerciales, con pequeñas modificaciones, exceptuando el caso de la citocina TGF-β cuyo kit de ELISA requiere un paso previo de dilución de la muestra 1:5 en PBS y añadir una solución 1N de HCl con una relación 1:25. Las muestras acidificadas se incuban 60 minutos a 4°C y se neutralizan con NaOH 1N a una dilución 1:25. A continuación, se puede comenzar el protocolo descrito para la casa comercial de Diaclone.

5. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados usando el test de Fisher, test χ^2 , test 2-factor ANOVA (para los parámetros cuantitativos), y análisis de regresión múltiple (para IgE total, IgE específica, IgG4, IgA y los niveles de citocinas). Cuando se realizaron múltiples comparaciones, se utilizó un test ANOVA con ajustes de Bonferroni *post-hoc* para minimizar asociaciones al azar. La significación estadística fue establecida a partir $p < 0,05$.

6. Medida de la respuesta celular reguladora

6.1. Descongelación de células

La descongelación debe ser rápida para prevenir la formación de cristales que producirían daño celular y pérdida de viabilidad en el momento en que la temperatura sube de -50°C a 0°C.

El protocolo utilizado consiste en sacar el vial del nitrógeno líquido y descongelar rápidamente en una campana de flujo laminar (condiciones estériles), añadiendo medio de cultivo completo fresco (RPMI-1640, 1% Penicilina-Streptomycin (Gibco, Carlsbad, California, Estados Unidos), 1% Glutamina (Gibco), 10% Suero de ternera fetal inactivada (30 minutos a 56 °C), 1% Piruvato de Sodio (Gibco) para eliminar los efectos tóxicos de los crioprotectores.

La suspensión de células se diluye en un tubo de 50 ml con medio de cultivo completo. Se centrifuga 10 minutos a 675 g en una centrífuga *Allegra X-15R* (Beckman Coulter) para eliminar el medio. El precipitado celular se resuspende en medio completo y se cuentan las células según el procedimiento descrito en el apartado 2.2. Repetimos el proceso de lavado y resuspendemos las células en un volumen adecuado para dejarlas en una concentración aproximada de $1 \cdot 10^6$ células/ml.

6.2. Extracción de RNA

La extracción de RNA total se realizó en un entorno libre de ribonucleasas, siguiendo el protocolo de extracción de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, California, Estados Unidos) a partir de PBMCs (1.10^6 células) descongeladas según el protocolo descrito en la sección 6.1. Brevemente, las células descongeladas, se añaden a un tubo (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) de 2 ml, libre de ribonucleasas y se centrifugan a 12.000 g durante 10 minutos en una microfuga Mikro 24-48 (Hettich AG, Tuttlingen, Alemania) para eliminar el sobrenadante y posteriormente, resuspender el sedimento celular en 800 μ l de Trizol (Invitrogen). Las células se incuban y agitan en un *vórtex* Heidolph Reax Top (Heidolph, Schwabach, Alemania) durante 5 minutos, a temperatura ambiente, para conseguir la liberación de los ácidos nucleicos.

A continuación, se añaden 200 μ l de cloroformo (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, Estados Unidos) por cada ml de Trizol y se agita vigorosamente, incubándose a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Posteriormente, las muestras se centrifugan a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C en una microfuga Mikro 24-48 (Hettich AG). Tras la centrifugación observamos tres fases claramente diferenciadas:

- Fase inferior: fenol/cloroformo (fase proteica).
- Interfase: DNA.
- Fase superior: fase acuosa, donde se localiza el RNA.

La fase acuosa superior se recoge intentando no aspirar el anillo intermedio ni la fase inferior, y se pone en un nuevo tubo de 2 ml, en el que se añaden 500 μ l de isopropanol por ml de Trizol, para conseguir la precipitación del ácido nucleico. Las muestras se incuban durante 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación se centrifugan a 12.000 g durante 10 minutos a 4°C.

El sobrenadante se decanta y se lava el sedimento con 1 ml de etanol al 75% por cada ml de Trizol, para después centrifugar a 7.500 g a 4°C durante 5 minutos.

El sobrenadante se elimina cuidadosamente para no aspirar el sedimento de RNA y se deja secar durante 10 minutos. Por último, se resuspende el sedimento en 25 μ l de agua libre de ribonucleasas (Experion DEPC-Treated Water, Biorad) y se procede a la cuantificación, realizada según el protocolo descrito en la sección 2.4.

6.3. Medida de la integridad de RNA

Para conocer la integridad de las muestras de RNA se utilizó un Bioanalizador 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, California, Estados Unidos) que se basa en los patrones de movilidad electroforética de las muestras en una matriz de gel que se introduce en unos pequeños chips formados por una serie de microcanales y depósitos en miniatura. El rango cuantitativo del Bioanalizador es de 25-500 ng/ μ l.

Para la preparación y análisis de las muestras de RNA se utilizó el kit RNA 6000 *Nano* de Agilent. Primero se prepara la matriz de gel. Para ello se filtran 550 μ l de gel en una columna con filtro suministrada en el kit RNA 6000 *LabChip* (Agilent Technologies) centrifugando a 1.500 g durante 10 minutos. Se recogen 65 μ l de este filtrado en un nuevo tubo y se añade 1 μ l del colorante concentrado suministrado en el kit. La mezcla se homogeneiza en un *vórtex* Heidolph Reax Top (Heidolph) y se centrifuga a 13.000 g durante 10 minutos. Mantener en oscuridad.

A continuación, se coge 1 μ l de RNA 6000 *ladder* (marcador de peso molecular), suministrado en el kit, en un tubo libre de ribonucleasas y se desnaturaliza a

70 °C durante 2 minutos. Esta operación se realiza también con las muestras a analizar en el chip. Mantener en hielo una vez desnaturalizadas.

Antes de preparar el chip hay que limpiar los electrodos del bioanalizador (para evitar contaminaciones y degradación de las muestras). Para ello, el kit incluye dos chips de limpieza, uno para cargar con 350 µl de solución limpiadora *RNaseZap* (Invitrogen) y otro, con 350 µl de agua libre de ribonucleasas. El chip con la solución limpiadora se mantiene 1 minuto en el bioanalizador. Después se coloca el chip con agua durante 10 segundos y se deja secar el pedestal otros 10 segundos al aire. Este proceso debe repetirse al finalizar la cuantificación de RNA.

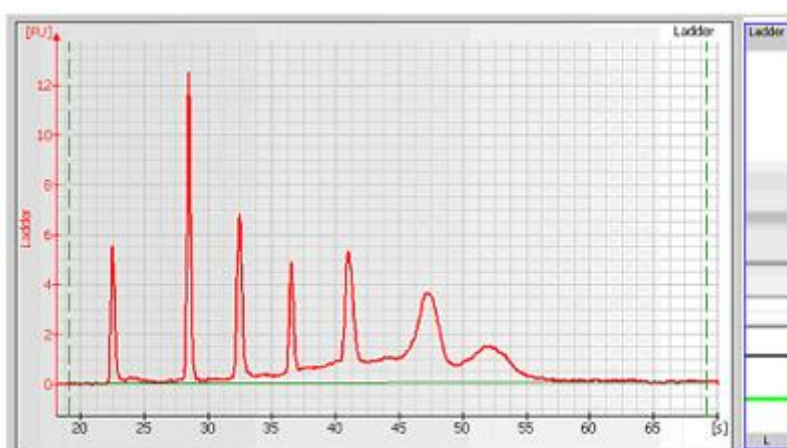
El chip para las muestras se coloca en una plataforma especial para su montaje suministrada junto al aparato, y se pipetea 9 µl de la mezcla gel/colorante en el pocillo marcado como “G” en color negro. Se introduce la jeringa de la estación en el chip y por presión se introduce el gel en el chip, dejando actuar la presión exactamente 30 segundos, tras los cuales se libera el chip.

Se cargan 9 µl de la mezcla gel/colorante en los restantes pocillos marcados como “G” en color gris. Después se cargan 5 µl del marcador *Nano Marker* del kit en todos los pocillos del chip y 1 µl del marcador de peso molecular (*ladder*) en el pocillo marcado con el símbolo de marcador. Finalmente, se carga 1 µl de muestra en cada pocillo. Si no tenemos suficientes muestras para llenar un chip, es necesario añadir entonces 1 µl de agua desionizada en los pocillos no ocupados.

El chip se coloca en un agitador especial IKA (Agilent Technologies) y se agita durante 1 minuto a 240 rpm, tras los cuales, está listo para ser leído en el Bioanalizador mediante el *software* Agilent 2100 Biosizing Software, que reconocerá el tipo de chip que estamos introduciendo. El mismo *software* analiza los datos obtenidos.

Una vez finalizado, los resultados aparecen en pantalla (o pueden cargarse en el menú *Data*). Uno de los electroferogramas que debe aparecer es el del marcador de peso molecular, que debe ser similar a esta imagen:

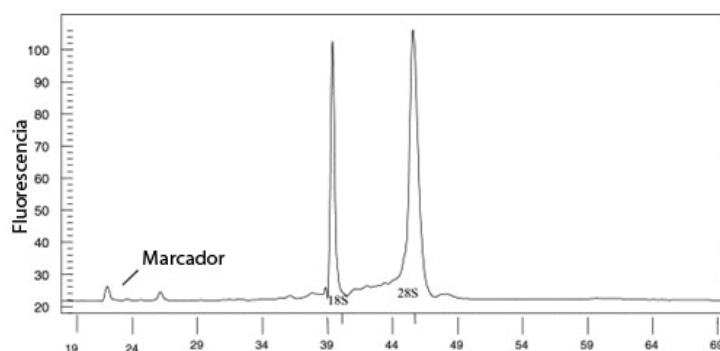
Figura 9. Imagen de 6000 RNA Nano *ladder*



Donde se observa claramente un primer pico correspondiente al marcador *Nano Marker*, y a continuación 6 picos correspondientes al *ladder*.

En la ventana *Results* (Resultados) podemos ver las gráficas de cada una de nuestras muestras. Una muestra de RNA total eucariota bien resuelta debe asemejarse a la siguiente gráfica:

Figura 10. Gráfica de una muestra de RNA de buena calidad



En una muestra, se debe observar un primer pico correspondiente al marcador (normalmente de tamaño bastante inferior al de la muestra) después los dos picos ribosomales bien diferenciados. La presencia de picos anchos o de más picos indica contaminación del RNA o degradación. En la pantalla también aparecerá la concentración de RNA calculada, la relación de absorbancias de los picos y el número RIN (*RNA Integrity Number*), un valor proporcionado por el *software* y que indica la integridad y calidad del RNA de la muestra. Este valor se da en una escala del 1 al 10, siendo 10 el RNA completamente intacto. Un valor de RIN a partir de 7,5 se considera aceptable para conseguir resultados fiables en posteriores experimentos.

6.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la cuantificación de mRNA

6.4.1. Síntesis de DNA complementario (cDNA)

La síntesis de DNA complementario se realiza a partir de 800 ng de RNA de cada muestra, usándose para el proceso el kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos).

Siguiendo el protocolo comercial de Applied Biosystems, se prepara una reacción con un volumen final de 20 µl, de los cuales 4µl corresponden a la mezcla de reacción *High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix* (Applied Biosystems) que incluye enzima retrotranscriptasa, cebadores, MgCl₂, dNTPs y *buffer* en concentraciones optimizadas por el fabricante. Se añade el volumen adecuado de material genético (que contenga 800 ng de RNA) y se ajusta con agua libre de ribonucleasas hasta los 20 µl totales.

La reacción de retrotranscripción (paso de RNA a cDNA) se llevó a cabo en un termociclador modelo *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems) con el siguiente programa: 5 minutos a 25°C, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C.

6.4.2. PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

La reacción de PCR a tiempo real permite conocer el nivel de expresión de un gen. En este caso, se estudió el nivel de expresión del gen FOXP3 en RNA extraído de PBMCs de los sujetos de estudio.

La reacción se lleva a cabo en un sistema de PCR a tiempo real modelo *ABI/Prism Sequence Detector System 7500* (Applied Biosystems) con placas de 96 pocillos.

Para cada reacción se utilizaron 33 ng de cDNA (el rango a utilizar se encuentra entre 10-100 ng según el gen a estudiar, en nuestro caso 33 ng son suficientes para dar una señal cuantitativa). El volumen final de reacción en cada pocillo de la placa es de 10 µl, de los cuales 5,5 µl son de la mezcla *Taqman Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems) que contiene todos los reactivos necesarios (*AmpliTaQ Gold* DNA Polimerasa, dNTPs y componentes de *buffer* optimizados por el fabricante), 0,5 µl de cebador comercial *Taqman Gene Expression Assays* (Applied Biosystems) con marcaje en FAM (6-carboxifluoresceína) y hasta 4,5 µl de volumen de cDNA, completando el volumen final con agua libre de ribonucleasas.

Los cebadores utilizados fueron, para el gen FOXP3, Hs01085834_m1, y para el control endógeno, el RNA ribosomal de 18S, Hs99999901_s1. Existen otros genes válidos como endógenos que se expresan constitutivamente en todas las células, en nuestro caso el rRNA 18S presenta una alta homogeneidad en células PBMCs y es, por tanto, muy adecuado como gen endógeno.

El análisis utilizado fue de tipo *Single Plex* (se estudia un único gen por pocillo) analizando cada reacción por triplicado. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95 °C y 40 ciclos con dos temperaturas (15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60°C).

La expresión de FOXP3 fue normalizada respecto a la expresión del gen endógeno 18S y los datos se calcularon de acuerdo al método de Ct, siendo la expresión representada como:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

donde

$$\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{(experimental)}] - [\Delta Ct_{(control)}]$$

y

$$\Delta Ct = [Ct_{(FOXP3)}] - [Ct_{(18S)}]$$

Siendo Ct el ciclo en el que la expresión del gen comienza a ser exponencial. Se define como $\Delta Ct_{(control)}$ al valor correspondiente al sujeto no alérgico y a $\Delta Ct_{(experimental)}$ como al valor correspondiente al sujeto de otro grupo.

6.4.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico de FOXP3 fue realizado usando un test Wilcoxon en el programa R.

6.5. Microscopía confocal

6.5.1. Preparación y marcaje de las células

Se seleccionaron tres sujetos de cada uno de los siguientes grupos (en muestras tomadas en el periodo de polinización): Grupo 1 (no alérgicos), Grupo 4 (alérgicos al polen de olivo sin tratamiento) y Grupo 5 (alérgicos al polen de olivo con tratamiento específico). Las PBMCs se descongelaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 6.1.

Una vez cuantificadas las PBMCs de los sujetos, partimos de 1.10^6 células a las que se añadieron 100 µl de suero salino y los marcadores de superficie, que son los anticuerpos monoclonales de ratón anti-CD4 humano conjugado con PE (ficoeritrina) y anti-CD25 humano conjugado con APC (aloficocianina) (BD Biosciences, San Diego,

CA, Estados Unidos) de los cuales se añaden 10 y 5 μ l respectivamente, incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, para el correcto marcaje.

Posteriormente, se añaden 2 ml de suero salino isotónico para lavar y se centrifuga durante 10 minutos a 675 g en una centrífuga *Allegra X-15R* (Beckman Coulter, Brea, California, Estados Unidos) para eliminar el sobrenadante. El sedimento se resuspende en 2 ml de *Buffer A Human FOXP3* (10X) (BD Biosciences) diluido en agua desionizada a una proporción 1/10 y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Este *buffer*, (que contiene dietilenglicol y formaldehído) es necesario para la fijación de los receptores de membrana marcados, antes de permeabilizar las membranas de las PBMCs para realizar un marcaje intracelular.

Tras esta segunda incubación se elimina el sobrenadante mediante centrifugación durante 5 minutos a 675 g. El precipitado de células se lava con 2 ml de suero salino y se centrifuga de nuevo a 675 g durante 5 minutos para eliminar el sobrenadante.

Se añaden 500 μ l de *buffer C*. Este buffer se obtiene mezclando 1 μ l de *Buffer B Human FOXP3* (50X) (BD Biosciences) y 50 μ l de *Buffer A Human FOXP3* (10X) (BD Biosciences) diluido en agua desionizada en una proporción 1/10. Las células con *buffer C* se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, para permitir la permeabilización de las células.

Una vez permeabilizadas, las células se lavan con 2ml de suero salino y se centrifugan 5 minutos a 675 g para eliminar el sobrenadante.

Las células se resuspenden en 100 μ l de suero salino y se añaden a 20 μ l de anticuerpo monoclonal de ratón anti-FOXP3 humano marcado con Alexa Fluor 488 (BD Biosciences) y se deja en incubación otros 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.

Las células se lavan en 1 ml de suero salino (5 minutos a 670 g) y el precipitado de células se resuspende en medio completo o suero salino y se cuentan en una cámara de Neubauer siguiendo el protocolo previamente descrito (apartado 2.2.). Se ajustan a una concentración de 1.10^6 células/ml con suero salino, estando preparadas para su visualización por confocal.

Los controles de isotipo para el proceso de marcaje fueron anticuerpos de ratón IgG1 isotipo κ marcados con Alexa Fluor 488, PE y APC (BD Biosciences).

6.5.2. Análisis por microscopía confocal

Un total de 3.10^5 células (300 μ l) se colocan en una placa de microscopía de 8 pocillos (Ibidi, Martinsried, Alemania), sin ser sometidas a ningún proceso de fijación y por tanto, se encuentran en suspensión, para ser visualizadas en un microscopio confocal Leica SP5 (Leica, Wetzlar, Alemania).

Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo de inmersión en aceite (40X) usando el software LAS AF de Leica (Leica). Las células positivamente marcadas fueron contadas a partir de las imágenes obtenidas mediante múltiples secciones del eje Z.

7. Microarrays de expresión génica

Para el análisis de la expresión génica de los sujetos seleccionados se utilizó el chip de oligonucleótidos HuGe U133 plus 2.0 GeneChip de Affymetrix.

7.1. Selección y preparación de muestras para microarrays

La población de estudio para el análisis de expresión génica por microarrays estuvo compuesta por 30 sujetos, 6 sujetos de cada uno de los 5 grupos clínicos de estudio, seleccionados de la población inicial, de los que se analizaron muestras en los dos momentos de exposición.

El RNA total de estos sujetos fue aislado de las PBMCs (1.10^6 células) usando el método de Trizol (Invitrogen) ya descrito en el apartado 6.2.

El RNA fue cuantificado por espectrofotometría según apartado 2.4., y su integridad fue confirmada con un Bioanalizador de Agilent (Agilent Technologies) siguiendo el protocolo del apartado 6.3.

Se realizaron mezclas equimolares de dos RNAs de sujetos del mismo grupo (ratio 1:1) para maximizar el número de individuos en el estudio e incrementar la potencia estadística y la representación de variabilidad intra-individuo en la expresión génica. Esta estrategia aporta beneficios, ya demostrado en estudios anteriores (Kendzierski, C.M. y cols., 2005).

Se crearon 3 *pools* independientes para cada grupo clínico de estudio (sujetos no alérgicos, sujetos asintomáticos, pacientes alérgicos, pero no al polen de olivo, pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y pacientes alérgicos al polen de olivo con tratamiento específico). El número total de RNAs analizados por microarrays fue de 30 muestras, 15 por cada periodo de polinización.

7.2. Transcripción de RNA e hibridación con microarrays

7.2.1. Transcripción

El proceso de transcripción e hibridación con los microarrays fue realizado en el Parque Científico de la Universidad Complutense de Madrid.

Se transformaron 80 ng de RNA total a cDNA usando el kit para transcripción reversa de Affymetrix (Santa Clara, CA, Estados Unidos) en una ronda doble de transcripción *in vitro* (Figura 11).

El primer paso consiste en preparar los controles de RNA Poli-A y el *buffer* en que van diluidos (ambos incluidos en el kit *Poly-A RNA Control* de Affymetrix). Para 80 ng de RNA de partida, se necesita una dilución 1:80.000 del *Poli-A Control Stock* diluido en el *Poli-A Control Diluent Buffer* hasta un volumen total de 100 μ l. A continuación, estos controles se utilizarán para preparar una mezcla con cebadores oligo(dT)-T7.

Las cantidades reflejadas en la Tabla 1 son suficientes para 10 muestras:

Tabla 1. Composición del Buffer Poli-A/oligo (dT)-T7

Reactivo	Cantidad (μ l)
Cebadores oligo(dT)-T7 (50 μ M)	2
Controles Poli-A diluidos	2
Agua libre de ribonucleasas	16

Una vez preparada la mezcla Poli-A RNA/oligo (dT)-T7 se mezclará con la muestra de RNA de estudio:

Tabla 2. Mezcla de reacción RNA / Buffer Poli-A/oligo (dT)-T7

Reactivo	Cantidad
Muestra de RNA	10-100 ng
Mezcla Poli-A RNA / oligo (dT)-T7	2 µl
Agua libre de ribonucleasas	completar volumen hasta 5 µl

Se incuba durante 6 minutos a 70° C, para después enfriar a 4° C como mínimo durante 2 minutos.

Para realizar el primer paso de síntesis de la primera cadena de cDNA en el primer ciclo, se prepara la siguiente mezcla de reacción (por muestra), cuyos componentes vienen incluidos en el kit *Two-cycle cDNA Synthesis* (Affymetrix):

Tabla 3. Mezcla de reacción para la síntesis de la primera cadena de cDNA del primer ciclo

Reactivo	Cantidad (µl)
5X 1st Strand Reaction Mix	2
DTT 0,1 M	1
Inhibidor de ribonucleasas	0,5
dNTPs 10 mM	0,5
Enzima <i>SuperScript II</i>	1

Estos 5µl se transfieren a una muestra de RNA que lleve la mezcla Poli-A / oligo (dT)-T7. Incubar 1 hora a 42° C, para después calentarla hasta 70° C durante 10 minutos para inactivar la enzima retrotranscriptasa. Enfriar al menos 2 minutos a 4° C.

El siguiente paso es la síntesis de la segunda cadena de cDNA del primer ciclo. Para ello, con los componentes del kit *Two-Cycle cDNA Synthesis* (Affymetrix) se prepara la siguiente mezcla de reacción (por cada muestra):

Tabla 4. Mezcla de reacción para la síntesis de la segunda cadena de cDNA del primer ciclo

Reactivo	Cantidad (µl)
Agua libre de ribonucleasas	4,8
MgCl ₂ 17,5 mM (recién preparado a partir de la solución 1mM)	4
dNTP, 10 mM	0,4
<i>E.coli</i> DNA polimerasa I	0,6
Rnasa H	0,2

Estos 10 µl de reactivos se añaden a la mezcla de reacción del paso anterior para obtener un volumen total de 20 µl, que se incubará durante 2 horas a 16 °C, 10 minutos a 75° C y al menos 2 minutos a 4° C.

Después de la síntesis de la segunda cadena se realiza una amplificación de cRNA. Para ello se prepara la siguiente mezcla de reacción IVT (*In Vitro Transcription Technology*) (cantidades por muestra), a partir de los reactivos suministrados en el kit *MEGAscript High Yield Transcription* (Ambion, Foster City, CA, Estados Unidos):

Tabla 5. Mezcla de reacción IVT

Reactivo	Cantidad (µl)
10X <i>Buffer</i> de reacción	5
ATP	5
CTP	5
UTP	5
GTP	5
Mezcla de la enzima <i>MEGAscript T7</i>	5

Estos 30 µl de volumen total se transfieren a la mezcla obtenida en el paso anterior. Se incuba 16 horas a 37° C. La muestra está lista para ser purificada o guardada a -20° C.

Para la limpieza del cRNA se utilizó el kit *GeneChip Sample Cleanup Module* (Affymetrix) que incorpora diferentes tampones de lavado.

Se añaden 50 µl de agua libre de ribonucleasas y 350 µl de IVT cRNA *Binding Buffer* a la reacción IVT obtenida del paso anterior. Se agita vigorosamente por pipeteo y se añaden 250 µl de etanol (96-100 %) a este lisado, mezclándolo bien.

La muestra se coloca en la columna IVT cRNA *Cleanup Spin Column* que irá colocada en un tubo de 2 ml. Se centrifuga 15 segundos a ≥ 8.000 g, descartando el sobrenadante. La columna se transfiere a un nuevo tubo de 2 ml. Se añaden 500 µl de IVT cRNA *Wash Buffer* a la columna y se centrifuga 15 segundos a ≥ 8.000 g. Se tira el sobrenadante y se añaden 500 µl de etanol 80% (v/v) en la columna. Se vuelve a centrifugar 15 segundos a ≥ 8.000 g y se tira el sobrenadante. Se abre la tapa de la columna y se centrifuga 5 minutos a máxima velocidad (≤ 25.000 g), eliminando el sobrenadante y el tubo de 2 ml.

Finalmente, se coloca la columna en un tubo de 1,5 ml y se pipetea 13 µl de agua libre de ribonucleasas directamente en la membrana de la columna. Se mantiene a temperatura ambiente durante 4 minutos, centrifugándose 1 minuto a máxima velocidad (≤ 25.000 g). El cRNA obtenido se cuantifica en un Nanodrop (apartado 2.4.).

En el segundo ciclo, se vuelve a sintetizar la primera cadena de cDNA a partir del material que se ha obtenido en el ciclo anterior. Para ello se utiliza el kit *Two-Cycle cDNA Synthesis* (Affymetrix). En primer lugar, se realiza una disolución fresca de cebadores al azar (*random*) a una concentración final de 0,2 µg/µl. Se añaden 2 µl de esta disolución al cRNA purificado anteriormente junto con agua libre de ribonucleasas hasta un volumen de 11 µl. Se deja incubar 10 minutos a 70° C. Posteriormente, la muestra se deja enfriar al menos 2 minutos a 4° C.

En un tubo aparte, se prepara la mezcla de reacción con los siguientes componentes (por muestra):

Tabla 6. Mezcla de reacción para la síntesis de la primera cadena de cDNA del segundo ciclo

Reactivo	Cantidad (μl)
<i>5X First Strand Reaction Mix</i>	4
DTT 0,1 M	2
Inhibidor de RNAsas	1
dNTPs 10mM	1
<i>SuperScript II</i>	1

Se añaden (mezclando bien por pipeteo) 9 μl de esta mezcla de reacción a cada muestra con los cebadores *random* para obtener un volumen final de 20 μl. Se incuban a 42° C durante 1 hora, tras la cual, se enfrían a 4° C durante al menos 2 minutos.

Se añade 1 μl de RNasa H a cada muestra, mezclándolo bien por pipeteo. Se incuba 20 minutos a 37° C, y después a 95° C durante 5 minutos. Mantener a 4° C durante al menos 2 minutos.

Para la síntesis de la segunda cadena de cDNA del segundo ciclo, en primer lugar se preparan cebadores Oligo(dT)-T7 diluidos a una concentración final de 5 μM.

Se añaden 4 μl de cebadores a la muestra obtenida del paso anterior, para tener un volumen final de 25 μl. Mezclar por pipeteo, para después incubar 6 minutos a 70° C. Dejar a 4° C al menos durante 2 minutos.

Se prepara una mezcla de 125 μl con los reactivos necesarios para realizar la síntesis de la segunda cadena de cDNA del segundo ciclo (por muestra):

Tabla 7. Mezcla de reacción para la síntesis de la segunda cadena de cDNA del segundo ciclo

Reactivo	Cantidad (μl)
Agua libre de ribonucleasas	88
<i>5X Second Strand Reaction Mix</i>	30
dNTPs 10 mM	3
DNA polimerasa I de <i>E. coli</i>	4

Esta mezcla se añade a cada muestra para obtener un volumen total de 150 μl. Se incuba durante 2 horas a 16° C. Se añaden 2 μl de DNA polimerasa T4 a las muestras, para después incubar durante 10 minutos a 16° C, tras lo cual, se mantiene a 4° C al menos durante 2 minutos.

El cDNA de doble cadena obtenido se limpia con el módulo de limpieza. Primero se añaden 600 μl de cDNA *Binding Buffer* al cDNA obtenido, asegurándose que el color de la disolución es amarillo. Si el color vira a naranja o violeta, añadir 10 μl de acetato de sodio 3M, pH 5.0. Se cargan 500 μl de esta mezcla en una columna cDNA *Cleanup Spin Column* suministrada en el kit *Sample Cleanup Module* (Affymetrix) que se colocará dentro de un tubo de 2 ml. Centrifugar 1 minuto a ≥ 8.000 g y tirar el sobrenadante. Se carga la columna con la disolución sobrante y se centrifuga de nuevo. Se transfiere la columna a un nuevo tubo de 2 ml y se lava añadiendo 750 μl del *cDNA Wash Buffer* en la columna. Se centrifuga 1 minuto a ≥ 8.000 g y se tira el sobrenadante.

La membrana de la columna se seca, centrifugando durante 5 minutos a máxima velocidad (≤ 25.000 g) sin tapa. Se transfiere la columna en un nuevo tubo de 1,5 ml y

se eluye el cDNA con 14 μ l de *cDNA Elution Buffer*. Finalmente, se incuba a temperatura ambiente durante 4 minutos y se centrifuga 1 minuto a máxima velocidad (≤ 25.000 g). De media, se obtienen unos 12 μ l por cada 14 μ l de *Elution Buffer*.

En este punto, no se recomienda la cuantificación ni mediante gel ni espectrofotométricamente debido a la presencia de varias especies de ácidos nucleicos que podrían interferir con los resultados.

Para la obtención de cRNA marcado con biotina utilizamos el kit *GeneChip IVT Labeling Kit* (Affymetrix). Se transfieren 12 μ l de cDNA a un tubo de microfuga libre de ribonucleasas y se añaden los siguientes componentes en el orden indicado (no realizar esta operación en frío):

Tabla 8. Mezcla de reacción para el marcaje de cRNA con biotina

Reactivo	Cantidad (μ l)
10X IVT <i>Labeling buffer</i>	4
IVT <i>Labeling NTP Mix</i>	12
IVT <i>Labeling Enzyme Mix</i>	4
Agua libre de ribonucleasas	completar hasta 40 μ l

Como control positivo pueden utilizarse de 0,5 a 1 μ g de controles marcados en 3' en lugar del cDNA de la muestra.

Estos componentes se mezclan y se incuban a 37 °C durante 16 horas en un termociclador ABI 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). El cRNA marcado resultante puede almacenarse a -70° C o bien proceder a su limpieza.

Para comenzar a limpiar el cRNA, se añaden 60 μ l de agua libre de ribonucleasas al cRNA marcado anteriormente y 350 μ l de *IVT cRNA Binding Buffer* mezclando bien. Posteriormente, se añaden 250 μ l de etanol (96-100%), se mezcla por pipeteo y se cargan 700 μ l de la mezcla en una columna *IVT cRNA Cleanup Spin Column* colocada dentro de un tubo de 2 ml. Se centrifuga 15 segundos a ≥ 8.000 g, desechando el sobrenadante.

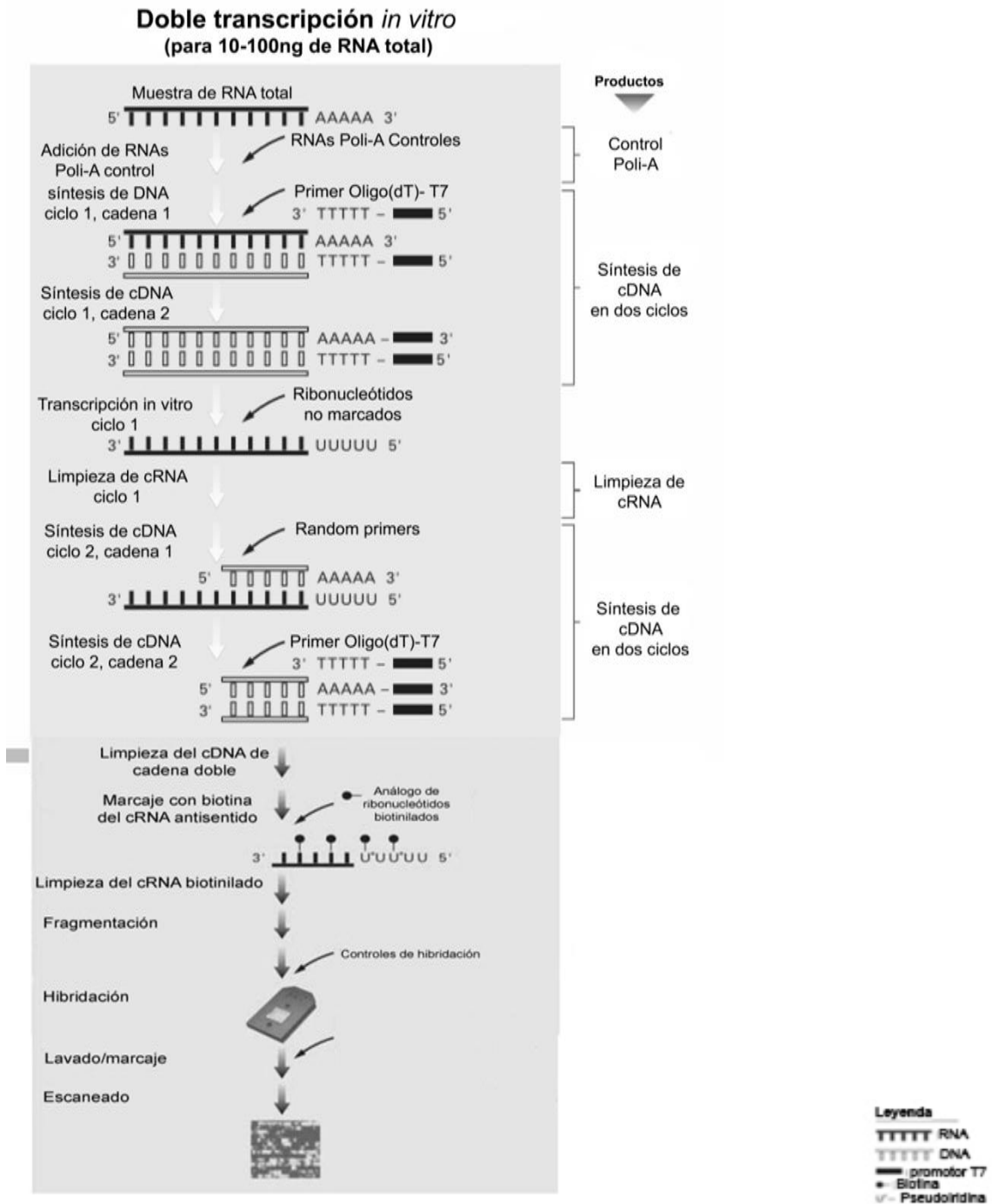
Se coloca la columna en un nuevo tubo de 2 ml. Se lava añadiendo 500 μ l de *IVT cRNA Wash Buffer* y se centrifuga 15 segundos a ≥ 8.000 g. Se tira el sobrenadante. Se añaden 500 μ l de etanol al 80% (v/v) en la columna y se centrifuga durante 15 segundos a ≥ 8.000 g, desechando el sobrenadante. Finalmente se elimina la tapa de la columna y se centrifuga 5 minutos a máxima velocidad (≤ 25.000 g), desechando el sobrenadante y el tubo.

La columna se coloca en un nuevo tubo de 1,5 ml y se añaden 11 μ l de agua libre de ribonucleasas directamente en la membrana de la columna para eluir la muestra, tras centrifugar 1 minuto a máxima velocidad (≤ 25.000 g).

Pipetear 10 μ l de agua libre de ribonucleasas en la membrana, centrifugar 1 minuto a máxima velocidad (≤ 25.000 g). Este proceso se repite 2 veces.

El cRNA puede ser ahora cuantificado mediante Nanodrop (apartado 2.4.) o Bioanalizador (apartado 6.3.). El cRNA se guarda a -70 °C.

Figura 11. Doble transcripción *in vitro*



7.2.2. Protocolo de hibridación

Se utilizó el chip HuGe U133 plus 2.0 GeneChip (Affymetrix), un microarray de oligonucleótidos, para ser hibridado con 10 µg de cRNA y procesado de acuerdo al protocolo del fabricante.

La reacción de hibridación se realizó con el kit *GeneChip Eukaryotic Hybridization Control* (Affymetrix), según el siguiente esquema:

- 10 µg de cRNA.
- Controles de oligonucleótidos B2 (3 nM) → 3,3 µl.

- Controles de hibridación (*bioB*, *bioC*, *bioD*, *cre*) 20X → 10 µl.
- DNA de espermatozoos de arenque 10 mg/ml (Promega, Fitchburg, Wisconsin, Estados Unidos) → 2 µl.
- BSA 50 mg/ml → 2 µl.
- *Buffer* de hibridación 2X → 100 µl.
- DMSO → 20 µl.
- Agua hasta completar un volumen de 200 µl.

Como controles positivos exógenos que verifiquen el proceso de marcaje se usan grupos de RNA control poliadenilado. Estos RNAs proceden de genes (*lys*, *phe*, *thr* y *dap*) de *B. subtilis* que no están presentes en las muestras eucariotas. Estos controles se amplifican y marcan junto a las muestras. Examinando la intensidad de hibridación de estos controles podemos observar cómo ha ocurrido el proceso de marcaje independientemente de la calidad de las muestras de RNA.

El protocolo de hibridación consistió en calentar la mezcla a 99 °C durante 5 minutos. Mientras tanto, humedecer el canal de pruebas del chip con 200 µl del *Hibridization Buffer* 1X e incubar durante 10 minutos a 45° C con rotación.

La mezcla realizada anteriormente a 99° C se calienta durante 5 minutos a 45° C y se elimina el *buffer* del array. Se cargan los canales con 200 µl de la mezcla que contiene el cRNA y se incuba el array en un horno de hibridación GeneChip *Hibridization Oven* 640 (Affymetrix) a 45° C, 60 rpm durante 16 horas. Después de este tiempo, se elimina la mezcla de hibridación y el chip se lava con 250 µl de *Buffer* A de lavado (compuesto de SSPE 6X, 0,01 % *Tween*-20 y agua) (SSPE: NaCl 3M, 0,2M NaH₂PO₄ y 0,02M de EDTA).

Para marcar el array, se utilizó el protocolo de la casa comercial, con los reactivos detallados a continuación:

Solución de marcaje (SAPE):

- 2X *Buffer* de tinción → 600 µl.
- 50 mg/ml BSA → 48 µl.
- 1 mg/ml de SAPE (Streptavidina Ficoeritrina) (Applied Biosystems) → 12 µl.
- Agua destilada → 540 µl.

El volumen final, que son 1200 µl, se divide en dos alícuotas.

Solución de anticuerpos:

- 2X *Buffer* de tinción → 300 µl.
- 50 mg/ml BSA → 24 µl.
- 10 mg/ml de anticuerpos IgG cabra → 6 µl.
- 0,5 mg/ml anticuerpo biotinilado → 3,6 µl.
- Agua → 266,4 µl.

La tinción y lavado del array, se hicieron en la estación de fluidos *Fluidics Station* 450, seleccionando el protocolo EukGE-WS2v5_450.

En los viales correspondientes, se cargan 600 µl de solución SAPE (vial 1), 600 µl de anticuerpo anti-estreptavidina biotinilado (vial 2) y otros 600 µl de solución SAPE (vial 3). Se colocan las agujas dentro de los viales y se inicia el protocolo automático, anteriormente mencionado.

Tras este proceso el chip está listo para ser escaneado.

7.3. Escaneado

Los chips fueron escaneados en un Affymetrix GeneChip *Scanner* 3000 (Affymetrix).

El *software* Affymetrix GeneChip *Operating Software* (GCOS) realiza todo el proceso, guardando las imágenes escaneadas en un fichero “.dat”. GCOS calcula automáticamente los archivos “.cel” (*Cell Intensity File*) a partir de los archivos “.dat”, que contienen un sólo valor de intensidad para cada sonda calculada con el algoritmo Microarray Suite 5.0 (MAS5.0).

7.4. Normalización y corrección de datos

Con el fin de poder obtener la mejor y mayor información posible de los datos conseguidos con los microarrays, se colaboró con el Dr. Manuel Mata (Adjunto de Investigación del Área de Medicina Molecular del Hospital General Universitario de Valencia) experto en microarrays, y también con los Drs. David Montaner y Joaquín Dopazo, especialistas en microarrays del Departamento de Bioinformática de la Unidad de Genómica Funcional del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), en Valencia.

Los niveles de expresión observados en los microarrays incluyen las variaciones introducidas durante la preparación de muestra, manipulación del microarray y su procesamiento (marcaje, hibridación, escaneado) y suponen una variación que puede interferir con la biológicamente relevante (Hartemink, A.J. y cols., 2001), por ello el primer paso del análisis de los datos de expresión génica diferencial es la normalización de los mismos.

Los archivos “.cel” de Affymetrix incluyen la información sin procesar de los microarrays y su fondo fue corregido usando la metodología RMA (*Robust Multiarray Averaging*). Este método para la medición de la expresión génica a nivel de *probeset* (pares de oligos que representan cada gen), se basa en la medición de \log_2 (B(PM)), donde B(PM) son las intensidades de los PM (*Perfect Match*) corregidas frente al fondo (*background*). (Irizarry, R.A. y cols., 2003).

La intensidad de la señal fue normalizada usando el algoritmo de normalización por cuartiles. De todos los métodos propuestos para normalizar los arrays GeneChip, la normalización por cuartiles parece ser la más idónea (Bolstad, B.M. y cols., 2003). Esta normalización trata de que la distribución de las intensidades de las sondas sea idéntica para todos los arrays. El análisis de datos fue realizado usando el programa Partek *Genomics Suite*.

Los análisis preliminares incluyeron medidas de la calidad de los datos mediante chequeos estándar de calidad y análisis de componentes principales (PCA).

7.5. Análisis del microarray

La obtención de la expresión diferencial de todas las comparaciones fue llevada a cabo usando el test estadístico t limma-moderadas.

Se realiza un test para cada gen (o *probe set*) del microarray. Así, para cada gen se obtiene un estadístico de t junto a su correspondiente valor de p (llamados *raw p values*).

Estos valores de p (*raw p values*) tienen que ser corregidos con múltiples test para minimizar los falsos positivos del estudio. En este estudio se utilizó la corrección

propuesta por Benjamini-Hochberg para obtener valores de p ajustados (Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995) y controlar el FDR (*False Discovery Rate*), establecido en el 5%.

Todos los análisis fueron realizados usando el Babelomics *web suite* (Medina, I. y cols., 2010), una plataforma que integra varias herramientas para el análisis de datos genómicos.

7.6. Criterios para la selección de genes diferenciales

Para identificar los genes que muestran evidencia de estar diferencialmente expresados en las comparaciones realizadas, se necesita elegir un estadístico que permita ordenar la expresión diferencial. En este estudio se utilizaron principalmente dos criterios: la evaluación del cambio de expresión (*Fold change*) y la significación estadística (determinada con el valor de p ajustado, que se obtiene a partir del valor del estadístico t).

- *Fold Change*: se conoce como *Fold Change* a la relación entre la media del grupo experimental y el *baseline* (el basal). Es una medida para definir la expresión de RNA entre dos condiciones experimentales. Un *fold change* de 1 o -1 es un “no cambio” en la expresión y un *fold change* de 2 corresponde a duplicar el valor inicial, del mismo modo, un *fold change* de -2 indica dividir el valor inicial por la mitad. Normalmente suele considerarse que los genes con un *fold change* >2 y <-2 son significativos, aunque este dato hay que compararlo con el valor de p.

- Test t: el test t mide si las medias entre dos grupos son estadísticamente diferentes una de la otra. El estadístico t se calcula de la siguiente manera:

$$t = \frac{(X_T - X_C)}{\sqrt{\frac{\text{var } T}{n_T} + \frac{\text{var } C}{n_C}}}$$

$X_T \rightarrow$ media de las muestras T

$X_C \rightarrow$ media de las muestras Control

$\text{var } T \rightarrow$ varianza de las muestras T

$\text{var } C \rightarrow$ varianza de las muestras Control

$n_T \rightarrow$ número de muestras T

$n_C \rightarrow$ número de muestras Control

El propósito del test t es evaluar la hipótesis nula que dice que no existe diferencia entre las medias de dos muestras. El test t es un test paramétrico que es utilizado para analizar la media y la desviación de dos o más grupos de muestras basadas en diversas hipótesis, incluyendo una distribución normal de los datos.

Para calcular la probabilidad de que el valor observado en el test t sea debido a la hipótesis nula, los datos se asumen distribuidos normalmente.

El valor de p se calcula a partir del test t. Este valor nos muestra la probabilidad de haber obtenido el resultado si la hipótesis nula es cierta.

Por convenio, un valor de $p \leq 0,05$ se considera suficiente para rechazar la hipótesis nula, es decir, que existe diferencia real entre las medias ($\leq 0,01$ significaría una evidencia mucho mayor) (Stekel, D., 2003).

7.7. Análisis funcional de los datos del microarray

Además de analizar la expresión diferencial de los genes, se realizó un análisis funcional de los mismos, para lo que se utilizaron los bloques funcionales. Se utilizaron

los bloques funcionales de dos bases de datos, GO (*Gene Ontology*) *Biological processes* y KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) *Pathways*.

El análisis de los bloques funcionales fue llevado a cabo para cada una de las comparaciones del estudio. Usamos modelos de regresión previamente descritos (Sartor, M.A., 2009, Montaner, D., Dopazo, J., 2010) para encontrar los bloques funcionales enriquecidos en cada condición. Para cada comparación, se obtuvo el número de bloques estadísticamente significativos (p ajustado $< 0,05$) con su respectivo enriquecimiento génico, expresado como LOR negativo o positivo (*Logg Odds Ratio*).

La expresión diferencial por bloques de todas las comparaciones fue llevada a cabo usando estadísticas t-limma moderadas. Se realizaron correcciones convencionales de múltiple *testing* para p (Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995).

8. Validación de genes mediante qRT-PCR

8.1. Selección de genes

Tras el análisis de expresión génica diferencial y los análisis funcionales, se seleccionaron noventa y tres genes de los más representativos entre los 5 grupos clínicos estudiados con los microarrays, para su validación por qRT-PCR en una población mayor. El número de genes fue determinado por el diseño experimental del experimento.

El criterio de selección de los genes se realizó a partir de los datos obtenidos tras el análisis de microarrays, escogiendo genes que fuesen representativos del mayor número posible de rutas y procesos biológicos, y seleccionándolos por criterios estadísticos que incluyeron un *Fold Change* >2 o < -2 y un valor de $p < 0,05$.

8.2. Selección de sujetos

Se seleccionaron 80 nuevas muestras totales de la población inicial de estudio, diferentes a las utilizadas para el primer análisis de microarrays, cuya distribución por grupo y estación polínica está detallado en el apartado 5.4 de Resultados.

8.3. Preparación de las muestras

Una vez seleccionados los sujetos de estudio, el RNA total se extrajo de las PBMCs descongeladas mediante el método de Trizol, a partir de 1.10^6 células (según se describe en la sección 6.2.) y su calidad y cantidad fue comprobada en un Nanodrop según el protocolo descrito en el apartado 2.4.

Para el análisis de expresión de los genes se utilizaron tarjetas microfluídicas (TLDA) de 384 pocillos (Applied Biosystems) que permiten utilizar cantidades de muestra muy pequeñas y una gran cantidad de genes por tarjeta. Para su utilización se necesita el equipo ABI PRISM 7900HT *Real-Time* PCR (Applied Biosystems), por lo que se requirió de la colaboración al Parque Científico de Cantoblanco en Madrid.

Doscientos nanogramos de cada RNA fueron enviados al Parque Científico de Cantoblanco para ser analizados por *real-time* PCR usando el sistema *Taqman Gene Expression* (Applied Biosystems) para el análisis de 93 genes seleccionados, mediante el sistema de tarjetas.

El primer paso de este sistema, consiste en realizar la transcripción reversa, para convertir el RNA en cDNA. Para ello se utiliza el protocolo descrito en la sección 6.4.1.

8.4. Análisis de muestras por qRT-PCR en tarjetas microfluídicas

Se utilizaron tarjetas microfluídicas de 384 pocillos (Applied Biosystems) para el análisis de los 93 genes más 3 genes de referencia (18S, GAPDH, β_2 -microglobulina). Cada muestra se analizó por duplicado, utilizando un máximo de 100 ng de cDNA por reservorio.

Cada reservorio de la tarjeta microfluídica se carga con 50 μ l de cDNA obtenido en el paso anterior, diluido en agua libre de ribonucleasas y 50 μ l de *Master Mix Taqman Gene Expression* (Applied Biosystems) que contiene AmpliTaq Gold DNA Polimerasa ultrapura, Uracil-DNA glicosilasa para minimizar la contaminación, dNTPs con dUTP, un fluoróforo de referencia pasiva ROX y el *buffer*, en concentraciones optimizadas por el fabricante.

A continuación se centrifuga la placa en una centrífuga Heraeus (Thermo Scientific, Rockford, Estados Unidos) a 1.200 rpm durante 2 minutos, lo que provocará la resuspensión de las sondas Taqman y los cebadores en los pocillos de la tarjeta. Se deja equilibrar 15 minutos la placa a temperatura ambiente, y a continuación se sella con una selladora *Taqman Array Micro Fluidic Card Sealer* (Applied Biosystems,).

La reacción se llevó a cabo en un sistema de cuantificación a tiempo real 7900HT *System* (Applied Biosystems) con el programa *SDS Software* (Applied Biosystems).

8.5. Procesamiento de los datos de expresión génica obtenidos por qRT-PCR en tarjetas microfluídicas

La expresión de cada gen fue normalizada respecto a los tres genes endógenos y calculada de acuerdo al valor de Ct, asignado al inicio de la fase logarítmica de la amplificación. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa StatMiner.

Después de la normalización, se clasificaron las muestras según su expresión génica con un modelo jerárquico no supervisado mediante el programa StatMiner.

La sensibilidad de esta separación, es decir, la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo dentro de su grupo, se calculó de la siguiente forma (Fernández, P.S., Diaz, P.S., 2003).

$$\text{Sensibilidad} = \text{Verdadero Positivo} / (\text{Verdadero Positivo} + \text{Falso Negativo})$$

La especificidad es la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo sano, es decir, la probabilidad de que para un sujeto sano se obtenga un resultado negativo. Fue calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Especificidad} = \text{Verdadero Negativo} / (\text{Verdadero Negativo} + \text{Falso Positivo})$$

8.6. Análisis funcional de los datos de expresión génica obtenidos en tarjetas microfluídicas

Los genes diferenciales obtenidos tras el análisis estadístico anterior fueron reanalizados desde un punto de vista funcional. Este proceso fue realizado usando el programa DAVID *Bioinformatics Resources* 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) que permite identificar patrones biológicos enriquecidos, particularmente términos GO, y descubrir genes funcionalmente relacionados. Para ello se introducen los nombres de los genes en la base de datos y esta aplicación nos devuelve un listado de grupos que

comparten una biología común. Los genes normalmente poseen múltiples roles y pueden aparecer en más de un grupo funcional. Los grupos también aparecen ordenados según el número de genes que participan en cada proceso, ordenados de mayor a menor, en relación con la lista total introducida.

Para analizar las interacciones de las proteínas codificadas por los genes se utilizó la base de datos STRING 9.0 (*Known and Predicted Protein-Protein Interactions*) (<http://string-db.org/>). Las anotaciones sobre proteínas y el almacenamiento de las asociaciones proteína-proteína son más complejas que para otro tipo de datos. Esto es debido a que las proteínas tienen una variedad muy amplia de mecanismos y especificidades de actuación muy dependientes del contexto biológico. STRING es una base de datos cuyas principales ventajas son la precisión y la amplia cobertura a distintos niveles (más de 1000 organismos, 5 millones de proteínas, 200 millones de interacciones...).

Las proteínas codificadas por los genes diferenciales de este estudio se introdujeron a modo de lista en la pestaña *Multiple names*. La base de datos devuelve un gráfico con información detallada de cada proteína y sus conexiones, que pueden ser de distintos tipos, e indican qué fuentes ha utilizado para proponer la conexión proteína-proteína, así como los índices de probabilidad que indican una estimación de cómo de probable es la asociación propuesta:

- Neighbourhood* (proximidad): Proteínas que poseen un contexto genómico similar en diferentes especies, lo cual sugiere una función parecida.
- Fusion-fission events* (eventos de fusión): proteínas fusionadas en algunos genomas que muy probablemente funcionen juntas aunque en otros genomas no estén fusionadas.
- Occurrence* (concordancia): Proteínas con una función similar o que aparecen en la misma vía metabólica, suelen expresarse juntas o tener un perfil filogenético similar.
- Coexpression* (coexpresión): Asociación predictiva entre genes basada en los patrones de expresión simultánea.
- Experiments* (experimentos): Interacciones proteicas a partir de otras bases de datos de interacciones proteína-proteína.
- Databases* (bases de datos): Interacciones de grupos de proteínas extraídos de bases de datos.
- Textmining* (anotación): Interacciones de grupos de proteínas extraídos de sinopsis de la literatura científica.

Las proteínas relacionadas funcionalmente, habitualmente tienen distribuciones conectadas y estables, en su expresión génica. Esto permite visualizar posibles candidatos para un determinado tipo de respuesta (en este caso, la respuesta alérgica frente a polen de olivo). También puede permitir identificar nuevas proteínas/genes a partir de las vías enzimáticas o funcionales que hayamos encontrado.

Con todos estos datos, se mejora el conocimiento acerca de la conectividad de los genes implicados y pueden priorizarse futuros ensayos funcionales.

RESULTADOS

1. Sujetos de estudio

La clasificación de los sujetos que constituyen la población total de este estudio se hizo atendiendo a los criterios establecidos en el apartado 1.3 de Materiales y Métodos. La población total fue de 84 sujetos en el periodo de polinización, de los que 65 también pudieron ser estudiados fuera del periodo de polinización.

Las características clínicas y demográficas de los sujetos de estudio están resumidas en la Tabla 9.

Tabla 9. Características clínicas y demográficas de los sujetos de estudio

	N	Edad (años)	Sexo (%) mujer/hombre	Diagnóstico clínico
Grupo 1: No alérgicos	17	40,3±13,3	44/56	Sanos
Grupo 2: Asintomáticos*	10	33,6±6,6	60/40	Subclínicos
Grupo 3: Alérgicos no relacionados al polen del olivo	20	33,5±12,2	42/58	27,7% Anafilaxia 16,6% Reacción a picadura de insecto 38,8% Asma/Rinitis 16,6% Rinitis
Grupo 4: Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento	22	35,2±11,7	76/24 ^(a,b)	86,6% Asma/Rinitis 13,3% Rinitis
Grupo 5: Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia	15	30,8±10,4 ^(a)	87/13 ^(a,b)	83,3% Asma/Rinitis 16,6% Rinitis

**Pruebas cutáneas positivas al extracto de Olea europaea, pero sin otros síntomas clínicos. ^a Diferencia estadísticamente significativa con el Grupo 1. ^b Diferencia estadísticamente significativa con el Grupo 3.*

La edad fue homogénea (con un rango intermedio entre 30 y 40 años) excepto por la pequeña diferencia observada entre el grupo de sujetos no alérgicos y el grupo de sujetos alérgicos tratados con inmunoterapia ($p=0,033$).

En cuanto al género, hubo más mujeres en los grupos de sujetos alérgicos al polen de olivo (tanto con tratamiento como sin él) siendo estas diferencias estadísticamente significativas comparadas con los grupos de sujetos no alérgicos y de pacientes alérgicos pero no al polen de olivo (no relacionados).

Los pacientes alérgicos no relacionados con el polen de olivo fueron en su mayor parte sujetos alérgicos a picadura de insecto o bien a medicamentos. Los pacientes de este grupo con asma y/o rinitis tenían alergia a epitelio animal (perro, gato) o bien a ácaros.

El grupo de pacientes tratados con inmunoterapia específica al polen de olivo mejoró su *score* clínico (síntomas) tras el tratamiento, siendo los síntomas reflejados en la Tabla 9 los que presentaban los pacientes antes del tratamiento específico.

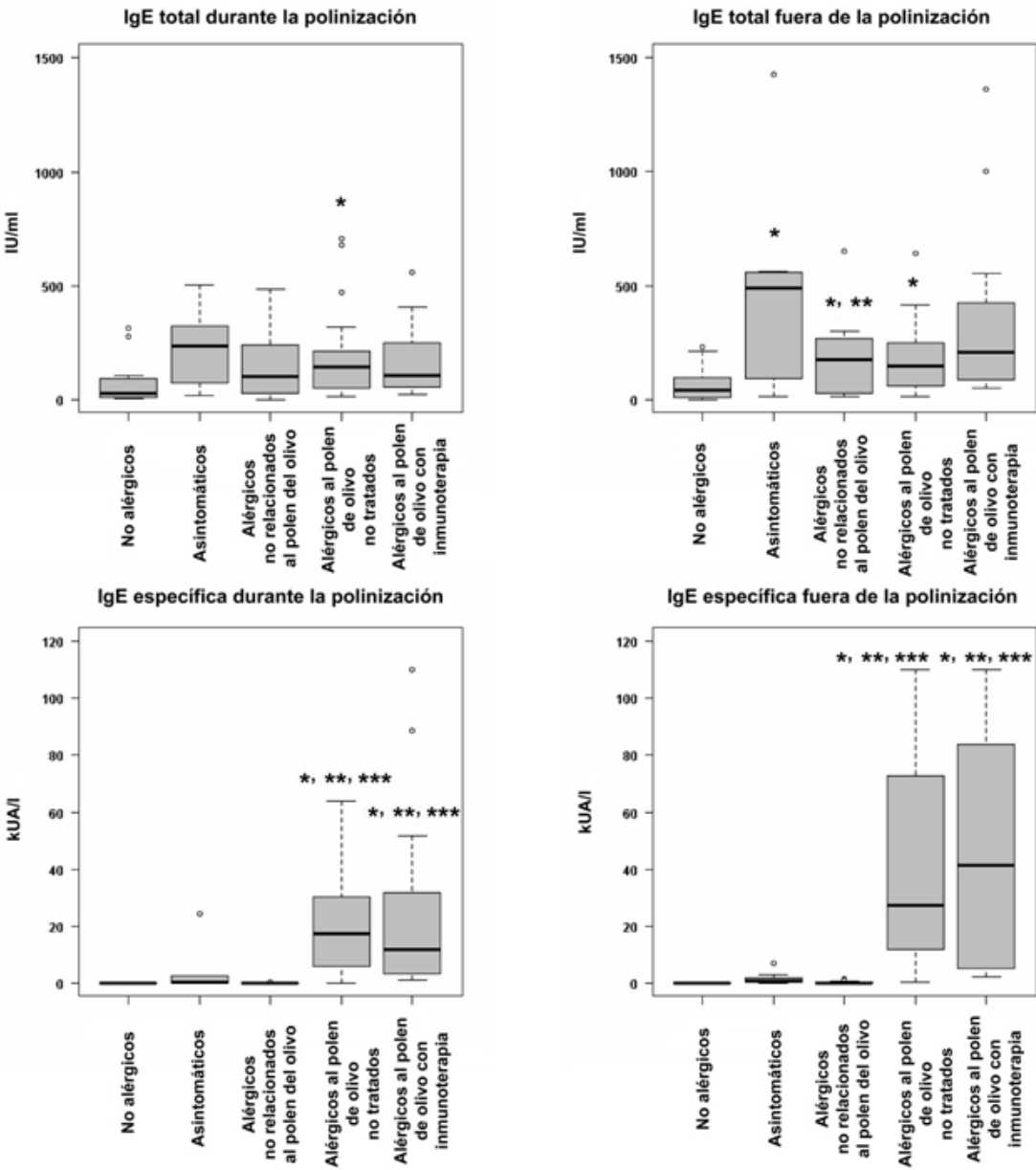
2. Niveles de IgE total y anticuerpos IgE, IgA e IgG4 específicos de Olea europaea

Con el fin de definir perfiles diferenciales de respuesta humoral en nuestros grupos clínicos, evaluamos como parámetros relacionados con la respuesta alérgica, los niveles de IgE total y anticuerpos IgE específicos, y como teóricamente implicados en la regulación de la respuesta, los niveles de anticuerpos IgA e IgG4 específicos. Estas determinaciones fueron realizadas en el suero de los sujetos de estudio recogidos en los dos periodos (durante y fuera del periodo de polinización). En la Figura 12 se muestran

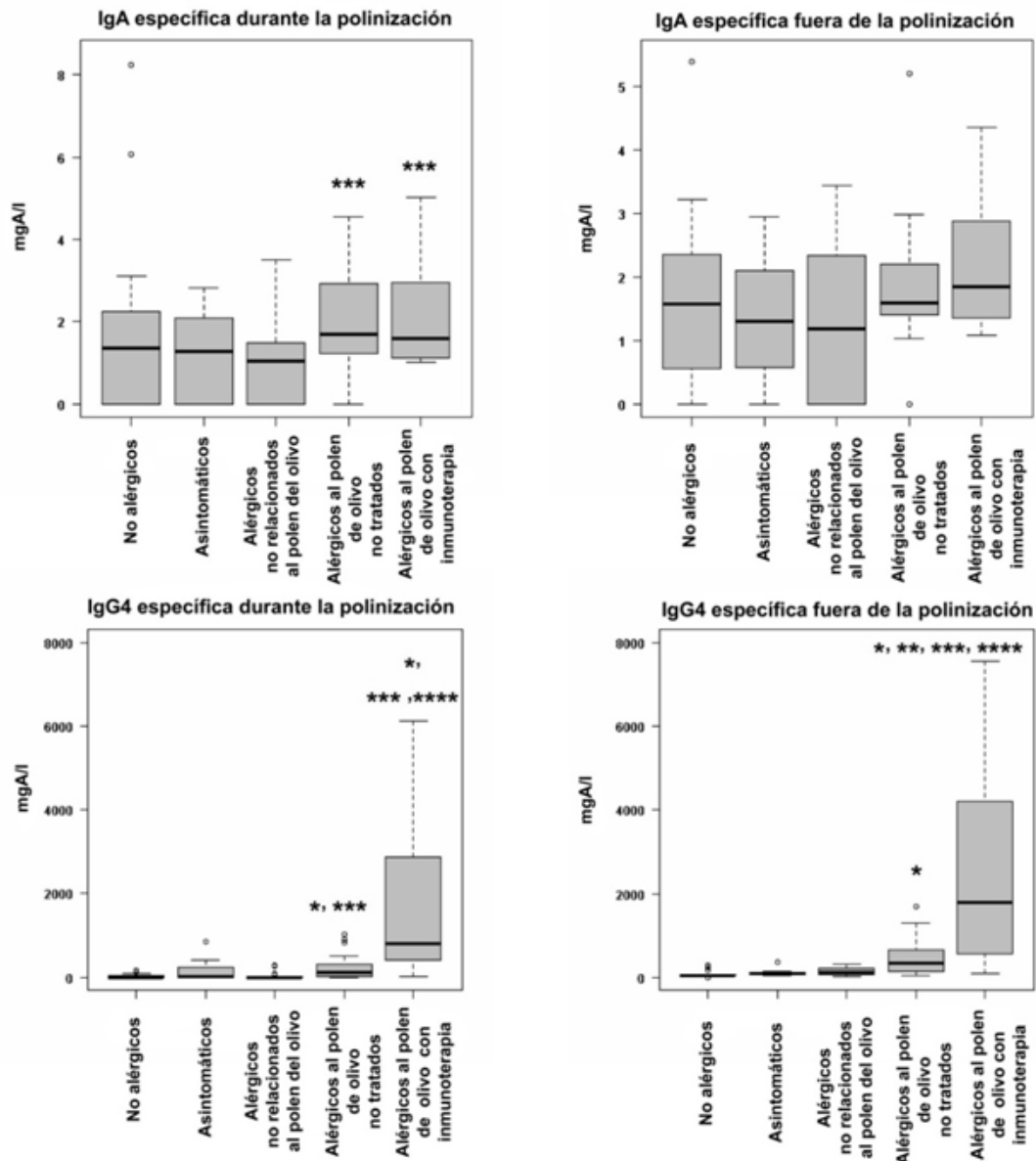
los niveles por grupo expresados como medianas y se señalan las comparaciones significativas entre grupos para el mismo periodo.

Figura 12. Niveles de IgE total y anticuerpos específicos (IgE, IgG4, IgA) frente al polen de olivo durante y fuera de la polinización

A) Respuesta Inflamatoria



B) Respuesta no-inflamatoria



A) Respuesta Inflamatoria y B) Respuesta no inflamatoria. Los datos se expresan en diagramas de caja (cuartiles) con la mediana. °Representa los valores atípicos (fuera de la caja). Se indican los valores límite superior e inferior con líneas horizontales. El número de asteriscos indica: * $p < 0,05$ comparado frente al grupo no alérgico. ** $p < 0,05$ comparado con el grupo asintomático, *** $p < 0,05$ comparado frente a los alérgicos no relacionados, **** $p < 0,05$ comparado con los alérgicos a polen de olivo, ***** $p < 0,05$ comparado con los pacientes alérgicos con inmunoterapia específica.

Las principales diferencias significativas entre grupos mostraron como los pacientes alérgicos al olivo sin tratamiento tuvieron niveles de IgE total significativamente mayores que los sujetos no alérgicos tanto durante, como fuera de la polinización (valores expresados en medias \pm desviación estándar) ($191,3 \pm 194$ IU/ml vs $70,1 \pm 91$ IU/ml durante la polinización, $186,7 \pm 173$ IU/ml vs $75,8 \pm 79$ IU/ml fuera de la polinización). Así mismo, fuera de la polinización también los sujetos asintomáticos tenían niveles de IgE total significativamente mayores que el grupo control (462 ± 488 IU/ml vs $75,8 \pm 79$ IU/ml). Los pacientes alérgicos no relacionados al polen de olivo

presentaron niveles de IgE total significativamente diferentes a los sujetos control ($179,9 \pm 164$ IU/ml vs $75,8 \pm 79$ IU/ml) y asintomáticos ($179,9 \pm 164$ IU/ml vs 462 ± 488 IU/ml) fuera de la polinización

En cuanto a los niveles de IgE específica, en ambos periodos son los pacientes alérgicos al olivo, tanto tratados como sin tratar (pacientes sin tratamiento: $23,12$ kUA/l durante la polinización, $45,7 \pm 41$ kUA/l fuera de la polinización; pacientes con tratamiento: $25,8 \pm 33$ kAU/l durante la polinización, $46,29 \pm 43$ kUA/l fuera de la polinización), los que muestran niveles significativamente mayores frente al resto de grupos del estudio (no alérgicos: $\leq 0,35$ kUA/l durante la polinización, $\leq 0,35$ kUA/l fuera de la polinización; asintomáticos: $3,26 \pm 7,4$ kUA/l durante la polinización, $1,88 \pm 1,2$ kUA/l fuera de la polinización; alérgicos no relacionados al polen de olivo: $\leq 0,35$ kUA/l durante la polinización, $0,5 \pm 0,38$ kUA/l fuera de la polinización)

Para los anticuerpos IgA, solo encontramos diferencias significativas en los pacientes alérgicos al polen de olivo (con o sin tratamiento) frente al grupo de alérgicos no relacionados al polen de olivo durante la polinización (alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs alérgicos no relacionados durante la polinización: $1,8 \pm 1,2$ mgA/l vs $1,3 \pm 1,1$ mgA/l; alérgicos al polen de olivo con tratamiento vs alérgicos no relacionados durante la polinización: $2,1 \pm 1,2$ mgA/l vs $0,95 \pm 1$ mgA/l).

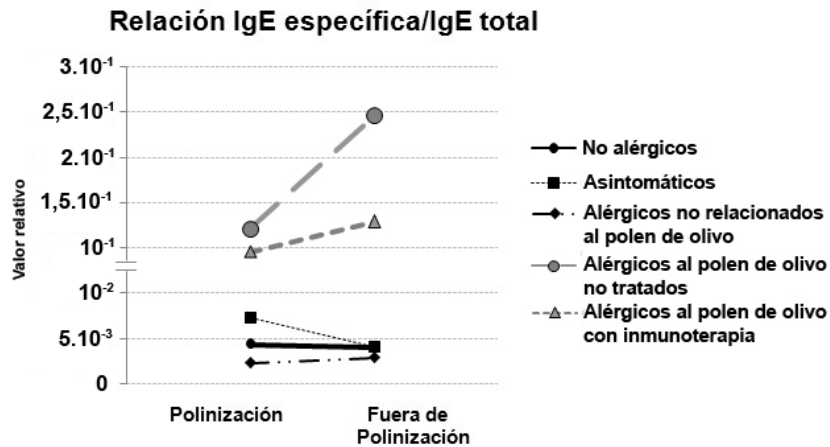
El anticuerpo específico IgG4 presenta diferencias significativas interesantes: durante la polinización, los pacientes alérgicos al olivo (con tratamiento: $229,2 \pm 306$ mA/l y sin tratamiento: $2418,7 \pm 3784$ mA/l) son más altos que los sujetos control ($29,08 \pm 50,9$ mA/l) y los pacientes no relacionados al polen de olivo ($35,9 \pm 83,9$ mA/l). Además los pacientes alérgicos al olivo tratados también son significativos frente a los pacientes alérgicos al olivo sin tratamiento. Sin embargo, fuera de la polinización, los pacientes alérgicos al olivo sin tratamiento (503 ± 496 mA/l) tienen niveles significativamente mayores de IgG4 que el grupo control ($81,7 \pm 83,5$ mA/l), pero los pacientes alérgicos al olivo con tratamiento (3007 ± 3286 mA/l), son significativos frente todos los grupos del estudio (no alérgicos: $81,7 \pm 83,5$ mA/l, asintomáticos: $931,1 \pm 920$, alérgicos no relacionados con el polen de olivo: $1375,5 \pm 93$, alérgicos al polen de olivo sin tratamiento: 503 ± 496 mA/l)

Así mismo, aunque no viene reflejado en la Figura 12, también encontramos diferencias significativas entre periodos de exposición para el anticuerpo IgG4 (valores expresados en medias \pm desviación estándar): en el grupo de controles no alérgicos ($29,08 \pm 50,9$ mgA/l vs $81,7 \pm 83,5$ mgA/l, durante la polinización vs fuera de la polinización), en el grupo de alérgicos no relacionados con el polen de olivo ($35,9 \pm 83,9$ mgA/l vs $137,5 \pm 93$ mgA/l, durante la polinización vs fuera de la polinización) y en el grupo de alérgicos al polen de olivo sin tratamiento ($229,2 \pm 306$ mgA/l vs 503 ± 496 mgA/l, durante la polinización vs fuera de la polinización).

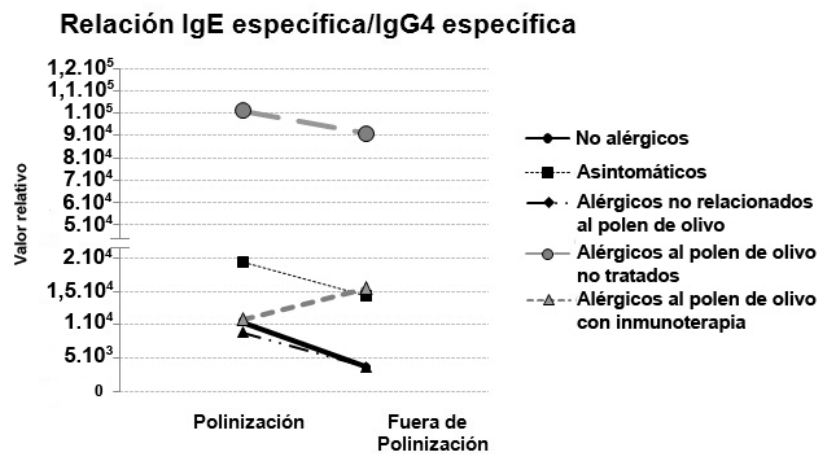
Con el objetivo de analizar estos datos, se calculó la relación entre anticuerpos específicos así como la relación entre los anticuerpos IgE total e IgE específicos para el polen de olivo.

Figura 13: Relación entre anticuerpos

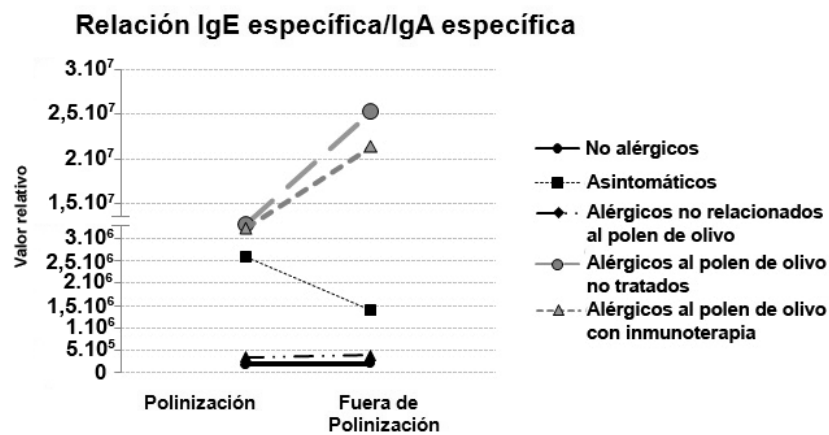
A)



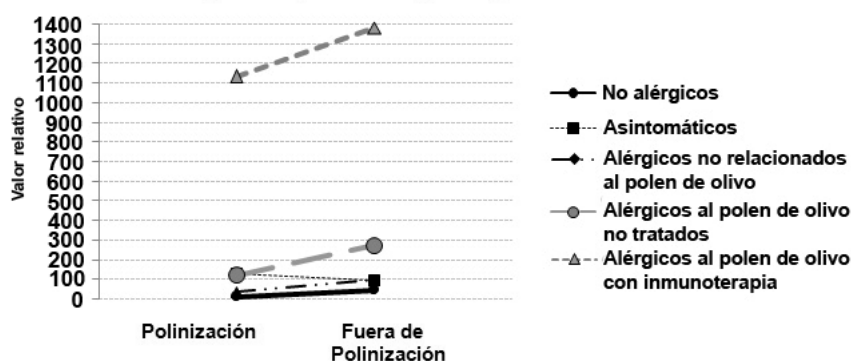
B)



C)



D) **Relación IgG4 específica/IgA específica**



Las gráficas expresan la relación entre los valores medios de anticuerpos específicos (Polinización/Fuera de Polinización). A) IgE específica/IgE total; B) IgE específica/IgG4 específica; C) IgE específica/IgA específica; D) IgG4 específica/IgA específica.

Las gráficas muestran que el grupo de sujetos no alérgicos y los pacientes alérgicos no relacionados con el polen de olivo tienen una respuesta específica muy baja, mientras que los pacientes alérgicos al polen de olivo, ya sean tratados o no, son los que exhiben los mayores niveles de anticuerpos específicos. El grupo de sujetos asintomáticos presenta un comportamiento intermedio.

Los pacientes alérgicos al polen de olivo, tanto tratados como no tratados, tienen los niveles más altos de anticuerpos IgE e IgG4 específicos fuera del periodo de polinización. La gráfica que muestra la relación IgE específica/IgE total los diferencia claramente del resto de grupos clínicos. Sin embargo, analizando el ratio de los niveles medios de anticuerpos específicos IgE/IgG4 se aprecia que los pacientes sin tratamiento tienen un relación hasta 10 veces mayor que los pacientes tratados durante la estación de polinización (Ratios: 100.859 vs 10.696) y 6 veces mayor fuera de este periodo (Ratios: 90.729 vs 15.391). Esto es debido a los elevados niveles de anticuerpos IgG4 específicos que poseen los pacientes tratados con inmunoterapia.

3. Niveles de citocinas

Se analizaron en suero los niveles de citocinas Th₁ (IFN- γ), Th₂ (IL-5, IL-4, IL-13 e IL-9), Treg (IL-10, TGF- β), IL-17 y TNF- α durante y fuera del periodo de polinización.

La Tabla 10 resume los niveles medios de citocinas por grupos clínicos de estudio.

Tabla 10. Niveles medios de citocinas en suero

A) Citocinas Th₁

Medias (pg/ml)	IFN- γ Pre	IFN- γ Post
Grupo 1: No alérgicos	9,35 \pm 11,14 (n=14)	42 \pm 12,23 (n=11)
Grupo 2: Asintomáticos	14,1 \pm 19,05 (n=10)	57,75 \pm 44,17 (n=5)
Grupo 3: Alérgicos no relacionados al polen del olivo	8,99 \pm 11,77 (n=18)	18,79 \pm 5,81 (n=15)
Grupo 4: Alérgicos al polen del olivo sin tratamiento	16,7 \pm 24,65 (n=18)	84,73 \pm 98,34 (n=11)
Grupo 5: Alérgicos al polen del olivo con inmunoterapia	7,72 \pm 11,14 (n=10)	56,95 \pm 21,95 (n=9)

B) Citocinas Th₂

Medias (pg/ml)	IL-4 Pre	IL-4 Post	IL-5 Pre	IL-5 Post	IL-9 Pre	IL-9 Post	IL-13 Pre	IL-13 Post
Grupo 1: No alérgicos	4,7 \pm 2,2 (n=13)	3,8 \pm 1,3 (n=13)	19,2 \pm 18 (n=15)	17,8 \pm 17,8 (n=13)	52,4 \pm 39 (n=15)	20,26 \pm 10 (n=13)	11,7 \pm 4,4 (n=15)	15,7 \pm 5,9 (n=13)
Grupo 2: Asintomáticos	12,8 \pm 8,8 (n=7)	15,1 \pm 14,1 (n=7)	2,5 \pm 1,3 (n=10)	31,2 \pm 31,2 (n=7)	17,26 \pm 18,9 (n=10)	8,87 \pm 4,1 (n=6)	7,05 \pm 2,5 (n=10)	21,6 \pm 20 (n=7)
Grupo 3: Alérgicos no relacionados al polen del olivo	19,8 \pm 11,1 (n=13)	14,8 \pm 7 (n=15)	9,5 \pm 4,6 (n=19)	6,6 \pm 4,7 (n=15)	21,24 \pm 6 (n=19)	97,5 \pm 82 (n=15)	12,7 \pm 6,5 (n=19)	14,7 \pm 6,1 (n=15)
Grupo 4: Alérgicos al polen del olivo sin tratamiento	12,1 \pm 7,2 (n=14)	21,4 \pm 13 (n=14)	13,5 \pm 5,2 (n=22)	9,6 \pm 6,07 (n=15)	204,4 \pm 169 (n=21)	31,3 \pm 11,9 (n=15)	14,6 \pm 7,1 (n=22)	19,5 \pm 11 (n=15)
Grupo 5: Alérgicos al polen del olivo con inmunoterapia	9,8 \pm 5,4 (n=12)	8,7 \pm 5,2 (n=12)	10,1 \pm 6,5 (n=15)	15,6 \pm 13,7 (n=12)	19,4 \pm 4,1 (n=15)	16,6 \pm 7,7 (n=12)	15,1 \pm 8,9 (n=15)	5,9 \pm 2,6 (n=12)

C) Citocinas reguladoras

Medias (pg/ml)	IL-10 Pre	IL-10 Post	TGF- β Pre	TGF- β Post
Grupo 1: No alérgicos	16,1 \pm 14 (n=9)	0,09 \pm 0,09 (n=13)	9894 \pm 3336 (n=15)	9051 \pm 3202 (n=13)
Grupo 2: Asintomáticos	17,8 \pm 17,8 (n=9)	80,1 \pm 80,1 (n=7)	7575 \pm 2418 (n=10)	10041 \pm 5818 (n=7)

Grupo 3: Alérgicos no relacionados al polen del olivo	21,4±21,4 (n=14)	0,13±0,13 (n=13)	13027±5168 (n=19)	11505±5697 (n=15)
Grupo 4: Alérgicos al polen del olivo sin tratamiento	20,2±13,7 (n=17)	1,8±1,5 (n=14)	5167±606^{5,*} (n=22)	34033±9606^{1,*} (n=16)
Grupo 5: Alérgicos al polen del olivo con inmunoterapia	7,28±6,3 (n=12)	15±15 (n=12)	10156±2476 (n=15)	11616±5329 (n=12)

D) IL-17 y TNF-α

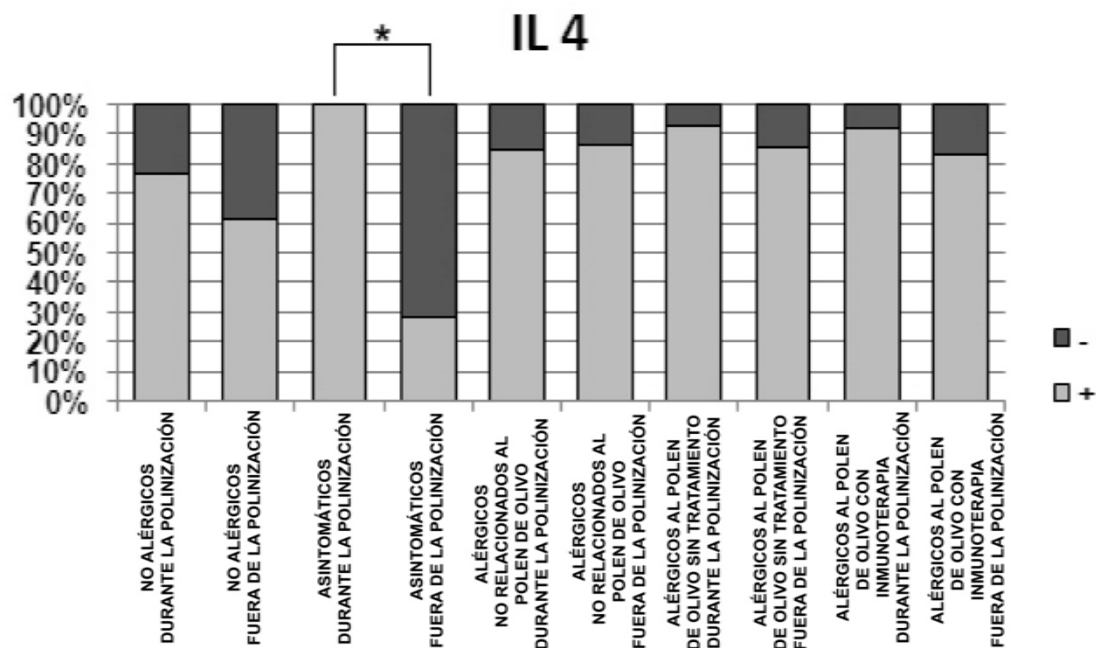
Medias (pg/ml)	IL-17 Pre	IL-17 Post	TNF-α Pre	TNF-α Post
Grupo 1: No alérgicos	51,3±7,8 (n=15)	64,5±18,8 (n=13)	88,1 ± 46 (n=14)	42 ± 35,9 (n=8)
Grupo 2: Asintomáticos	74,7±30 (n=10)	58,5±14,3 (n=7)	51,19 ± 35,3 (n=8)	57,75 ± 28,6 (n=4)
Grupo 3: Alérgicos no relacionados al polen del olivo	66,8±12,2 (n=18)	63,3±13,8 (n=15)	55,25 ± 32,6 (n=17)	30,96 ± 17,5 (n=12)
Grupo 4: Alérgicos al polen del olivo sin tratamiento	62,2±11 (n=22)	56,09±10 (n=15)	37,92 ± 16,4 (n=12)	84,7 ± 39,4 (n=11)
Grupo 5: Alérgicos al polen del olivo con inmunoterapia	57,1±6,48 (n=15)	50,1±12,6 (n=12)	16,3 ± 14,9 (n=5)	56,95 ± 28,8 (n=10)

Los datos representan la media ± desviación estándar. (Pre = Durante los meses de polinización, Post = Fuera del periodo de polinización). A) Citocinas Th₁; B) Citocinas Th₂; C) Citocinas reguladoras; D) IL-10 y TNF-α. ¹Estadísticamente significativo comparado con el Grupo 1, ⁵Estadísticamente significativo comparado con el Grupo 5. *Diferencias estadísticamente significativas entre el periodo de polinización y fuera del periodo de polinización.

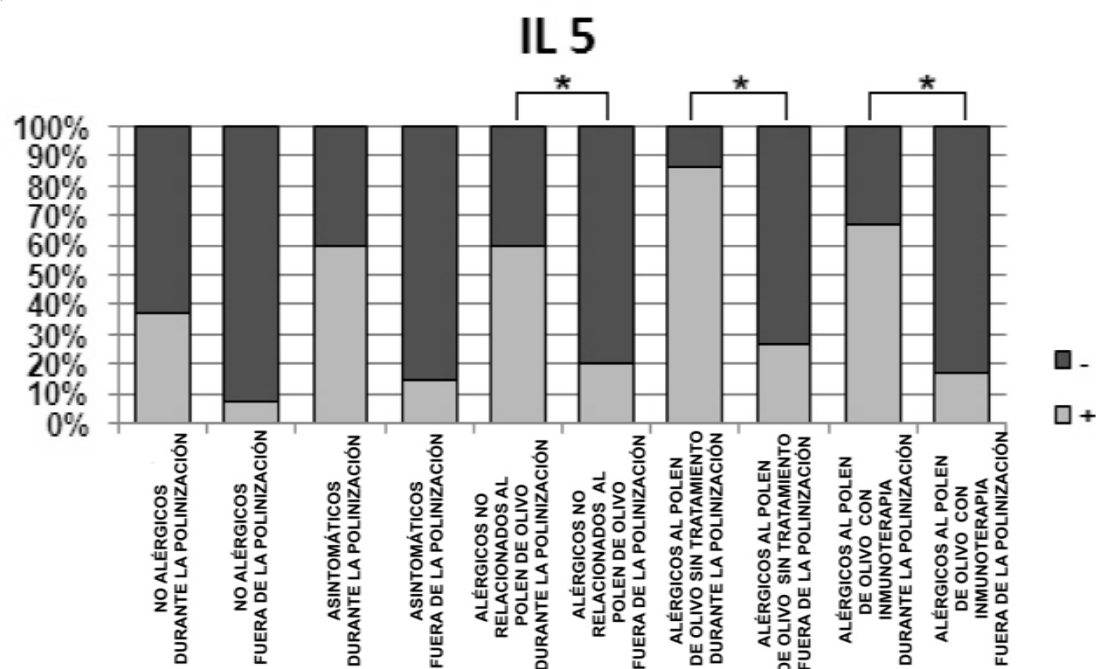
Aunque no hay diferencias estadísticamente significativas para los niveles medios de citocinas Th₂ y Th₁ entre los grupos, sí se han encontrado diferencias en el número de sujetos con niveles detectables de las citocinas IL-4 e IL-5 (Th₂) (Figura 14). El mayor número de sujetos con niveles detectables de IL-4 fue el grupo de sujetos asintomáticos durante el periodo de polinización (100 %), siendo este dato significativo al compararlo con los sujetos asintomáticos fuera de la polinización (que presentaron el menor número de sujetos, 28,5 %). Por otro lado, encontramos que el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento tenía el porcentaje de sujetos con niveles detectables de IL-5 más alto durante la polinización (86,3 %) siendo significativo comparándolo con el mismo grupo fuera de la polinización. El grupo de pacientes alérgicos no relacionados con la sensibilización al polen de olivo y el de alérgicos al polen de olivo con tratamiento, también tienen diferencias significativas entre ambos periodos de polinización.

Figura 14. Porcentaje de sujetos con niveles detectables de citocinas IL-4 e IL-5

A)



B)



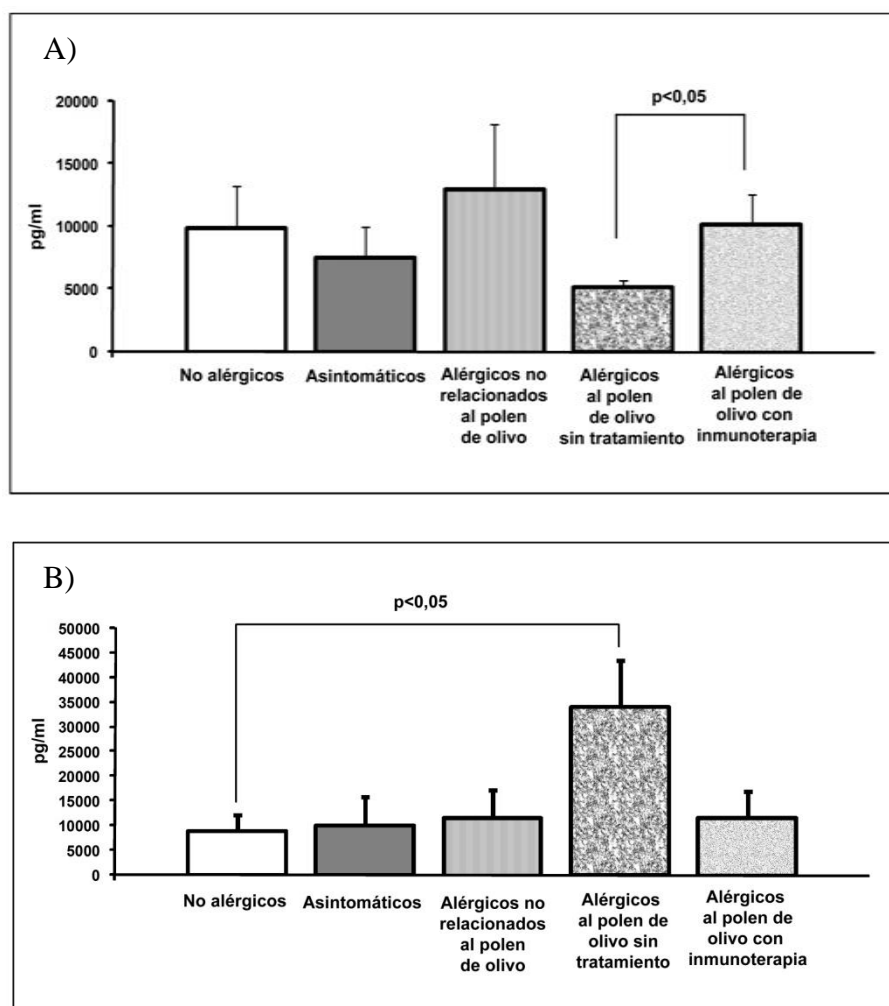
Gris claro representa el porcentaje de sujetos con niveles detectables de citocinas; gris oscuro representa los sujetos con niveles no detectables. * Indica las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

A) Resultados para IL-4, B) Resultados para IL-5.

No hubo diferencias significativas entre los grupos, ni en los niveles medios ni en el porcentaje de sujetos con niveles detectables, para IFN- γ , IL-9, IL-13, IL-10, IL-17 y TNF- α .

El resultado más relevante se encontró en los niveles de la citocina reguladora TGF- β . Los pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento mostraron los niveles más bajos de esta citocina (5.167 ± 606 pg/ml) durante la polinización, siendo estadísticamente significativos cuando se comparaban con los pacientes alérgicos al polen de olivo tratados en ese mismo periodo (10.156 ± 2.476 pg/ml). Sin embargo, fuera de la polinización, los pacientes alérgicos al polen de olivo no tratados mostraron los niveles más altos de TGF- β (34.033 ± 9.606 pg/ml) siendo estadísticamente significativos comparados con los sujetos no alérgicos (905 ± 3.202 pg/ml) como se muestra en la Figura 15.

Figura 15. Niveles medios de TGF- β en suero



Las gráficas representan los valores medios en suero para la citocina TGF- β junto a su desviación estándar. Se indican las diferencias significativas entre grupos ($p < 0,05$). A) Resultados durante la polinización; B) Resultados fuera de la polinización.

4. Respuesta celular reguladora

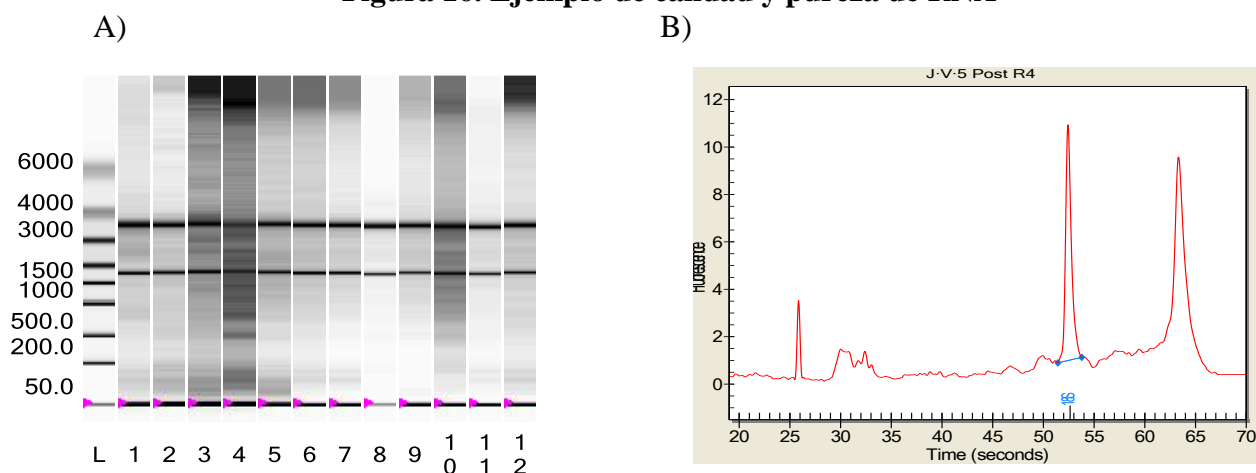
El descenso significativo de los niveles de TGF- β (citocina reguladora) en el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo no tratados, durante el periodo de polinización, hizo plantearse el estudio de la expresión génica de FOXP3, factor nuclear marcador de células reguladoras y cuya expresión es mantenida por TGF- β .

4.1. Extracción de RNA

El RNA de todos los sujetos del estudio se extrajo por el método de Trizol cuantificándose en un Nanodrop y analizando su pureza con un Bioanalizador (como se detalla en los apartados 2.4 y 6.3 de Materiales y Métodos).

La Figura 16 muestra un ejemplo de visualización de RNA purificado a partir de PBMCs de los sujetos de estudio. La parte A, muestra el perfil de un gel virtual de 12 muestras de RNA (carriles del 1-12), donde se observan las dos bandas de 18 y 28S. La parte B, muestra el gráfico obtenido para una muestra de RNA tras su migración en el bioanalizador, observándose las bandas de 18 y 28S, que nos señalan la pureza y el buen estado del RNA.

Figura 16. Ejemplo de calidad y pureza de RNA



A) Perfil en un gel virtual de 12 muestras de RNA (carriles del 1-12), L: Marcador de pares de bases; B) Visualización de una muestra en el bioanalizador.

La Tabla 11, resume las características y rendimiento de todas las muestras de RNA obtenidas, agrupadas en función del grupo de sujetos de estudio y momento de exposición, expresándose los datos medios de concentración de RNA, la cantidad total de RNA obtenido (a partir de 1.10^6 células) y el ratio medio de absorbancia 260/280 nm.

Tabla 11. Resultados medios de cantidad y calidad de RNA

	Grupo 1 pre (n=17)	Grupo 1 post (n=15)	Grupo 2 pre (n=10)	Grupo 2 post (n=7)	Grupo 3 pre (n=20)	Grupo 3 post (n=15)	Grupo 4 pre (n=22)	Grupo 4 post (n=15)	Grupo 5 pre (n=15)	Grupo 5 post (n=12)
[µg/ml]	58,5 ± 59,2	70,04 ± 77,7	44,4 ± 24,4	57,07 ± 40,6	43,02 ± 18,6	42,6 ± 26,09	27,8 ± 16,2	37,6 ± 35,6	57,8 ± 49,2	39,1 ± 46,7
µg totales	1,52 ± 1,7	1,78 ± 1,65	1,16 ± 0,36	1,22 ± 0,89	1,20 ± 0,50	1,24 ± 0,8	0,73 ± 0,45	0,91 ± 0,66	1,46 ± 1,06	0,93 ± 0,90
Ratio 260/280	1,58 ± 0,14	1,59 ± 0,17	1,53 ± 0,11	1,50 ± 0,6	1,60 ± 0,09	1,54 ± 0,06	1,50 ± 0,1	1,52 ± 0,13	1,70 ± 0,14	1,63 ± 0,14

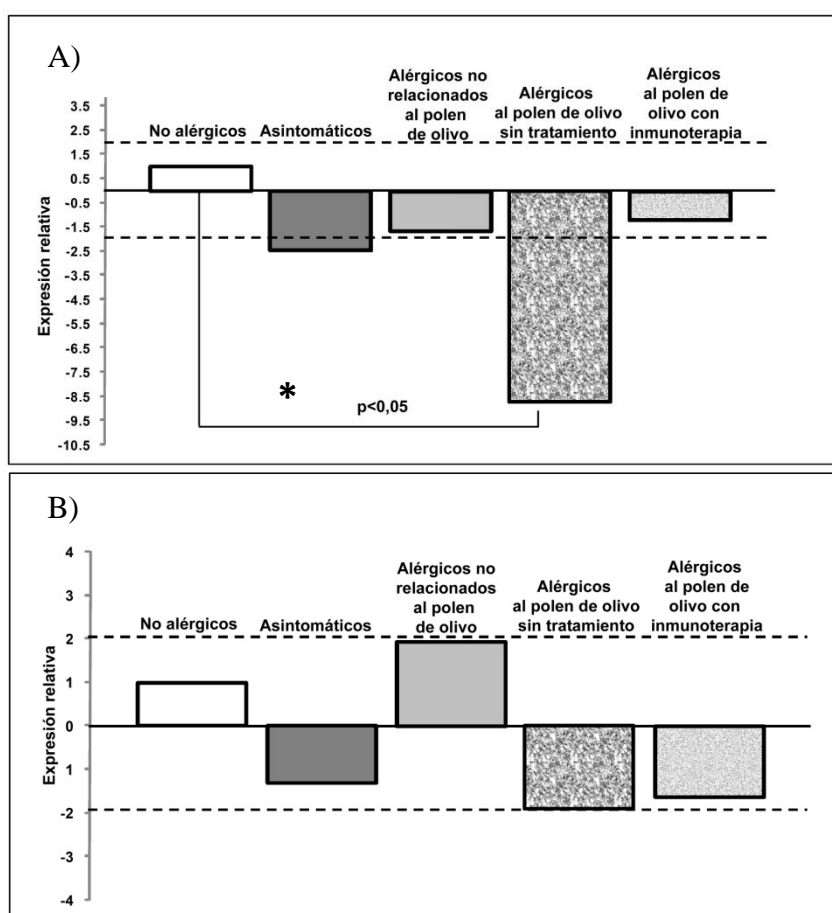
Valores medios ± desviación estándar. N= número de sujetos. Pre = Periodo de polinización, Post = Fuera del periodo de polinización.

Como se observa en la Tabla 11, aunque el rendimiento varió de unos grupos a otros, la calidad de las muestras fue similar en ambos periodos de exposición ambiental y se obtuvo RNA adecuado para hacer los estudios posteriores.

4.2. Cuantificación relativa de la expresión génica de FOXP3

El análisis de expresión génica de FOXP3 se realizó a partir de RNA extraído de 1.10^6 PBMCs de todos los sujetos de estudio mediante qRT-PCR (detallado en el apartado de Materiales y Métodos 6.4.2.). La expresión relativa media de mRNA de FOXP3 de los diferentes grupos clínicos comparada con el grupo control sano se resume en la Figura 17 (calculado tal y como se indica en al apartado 6.4.3. de Materiales y Métodos).

Figura 17. Expresión relativa de mRNA de FOXP3



La gráfica representa los valores medios de expresión relativa frente a los sujetos no alérgicos ($\Delta\Delta Ct$). *Indica las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). La línea discontinua delimita el límite de la técnica a partir del cual puede verse significación estadística. A) Resultados durante la polinización; B) Resultados fuera de la polinización.

El resultado más relevante fue el descenso significativo, de aproximadamente ocho veces, de la expresión relativa de FOXP3 en los pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento comparándolos con los sujetos no alérgicos durante la polinización. Otro dato muy interesante es que los pacientes alérgicos al polen de olivo tratados con inmunoterapia específica recuperan la expresión normal de FOXP3 hasta niveles similares a los que muestran los sujetos no alérgicos.

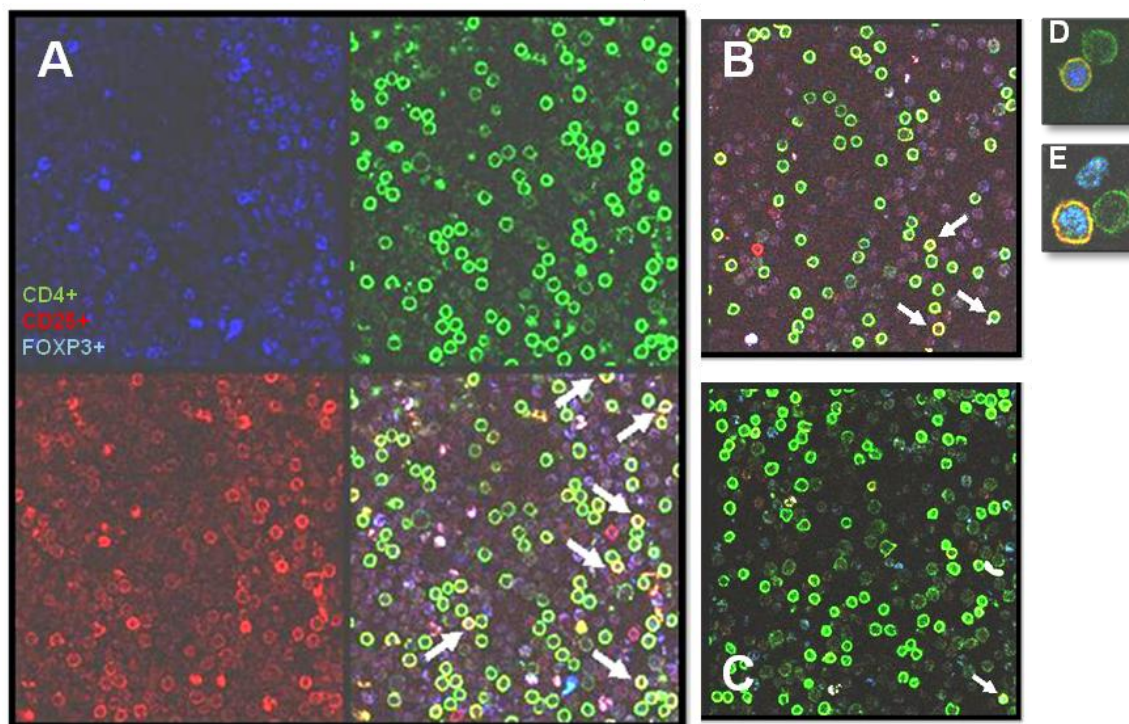
Por otro lado, fuera del periodo de polinización, la expresión de FOXP3 en pacientes alérgicos al polen de olivo no tratados mostró el mismo nivel que los sujetos control y los pacientes tratados.

4.3. Microscopía confocal

Para obtener resultados cualitativos que reforzasen los datos anteriores de expresión, se analizó la presencia de células T reguladoras en el periodo de polinización en las PBMCs en tres sujetos del grupo de sujetos control, alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y de pacientes alérgicos al olivo tratados, mediante microscopía confocal, marcando estas células con los anticuerpos de superficie para CD4 y CD25 y el anticuerpo intranuclear para Foxp3, según se detalla en apartado 6.5.1. de Materiales y Métodos.

La Figura 18 es un ejemplo representativo (n=3) de la presencia diferencial de células $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ en PBMCs no fijadas de un sujeto no alérgico, un paciente alérgico al polen de olivo no tratado y un paciente alérgico al polen de olivo tratado con inmunoterapia específica. Pueden apreciarse claras diferencias en la presencia de células con doble y triple marcaje. La mayor presencia de células con doble y triple marcaje fue observada en los controles no alérgicos, seguidos de los pacientes tratados con inmunoterapia y finalmente, la expresión más baja de FOXP3 y CD25 corresponde a los pacientes sin tratamiento.

Figura 18. Imágenes de microscopía confocal (expresión de CD4, CD25 y FOXP3 en PBMCs)

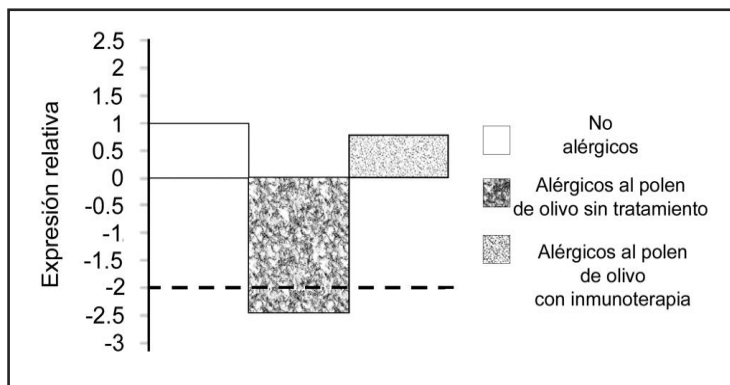


Marcaje: CD4+ verde; CD25+ rojo; FOXP3+ azul; co-localización CD4+/CD25+ amarillo.

Imagen A: (40X) sujeto no alérgico con los tres marcajes por separado y la imagen conjunta de los tres (abajo derecha). Imagen B: (40X) imagen conjunta de un paciente alérgico tratado. Imagen C: (40X) imagen conjunta de paciente no tratado. Imágenes D y E (80X) detalle de células reguladoras. Las flechas blancas señalan la presencia de algunas de las células reguladoras encontradas.

En estas PBMCs, analizadas por microscopía confocal, la expresión génica de FOXP3 fue también cuantificada mediante qRT-PCR, obteniéndose los resultados resumidos en la Figura 19.

Figura 19. Expresión génica de FOXP3 en PBMCs analizadas con microscopía confocal



La gráfica representa los valores medios de expresión relativa frente a los sujetos no alérgicos ($\Delta\Delta Ct$) durante la polinización. La línea discontinua delimita el límite de la técnica a partir del cual puede verse significación estadística.

De nuevo, se obtiene un descenso de la expresión del marcador de regulación FOXP3 en los pacientes alérgicos al polen de olivo no tratados cuando se compara con la expresión que presentan los sujetos no alérgicos. Los alérgicos al polen de olivo que han recibido inmunoterapia específica recuperan el nivel de FOXP3 a valores similares a los sujetos no alérgicos (controles).

Por tanto, ambas aproximaciones (expresión génica por PCR cuantitativa y microscopía confocal) confirman el descenso significativo de FOXP3, en el periodo de polinización, en los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y cómo esta expresión es, al menos parcialmente, recuperada en pacientes alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia específica.

5. Análisis diferencial de expresión génica entre grupos clínicos

5.1. Muestras de RNAs para su estudio mediante microarrays de expresión génica

El RNA extraído de 1.10^6 PBMCs de 60 muestras procedentes de los 5 grupos clínicos (6 sujetos por grupo, en los dos momentos de exposición, cuyas características vienen resumidas en la Tabla 12), tras ser analizado para comprobar su adecuada calidad y cantidad, se agrupó en *pools* de 2 RNAs por muestra (relación 1:1) para su análisis de expresión génica por microarrays. Finalmente, un total de 30 RNAs (3 *pools* por grupo, por 5 grupos clínicos, en dos momentos de exposición) fueron analizados por microarrays.

Tabla 12: Características clínicas y demográficas de los sujetos seleccionados para el análisis por microarrays

	N	Edad (años)	Sexo (%) mujer/hombre	Diagnóstico clínico
Grupo 1: No alérgicos	6	35 ± 10	50/50	No alérgicos
Grupo 2: Asintomáticos*	6	32 ± 10	50/50	Subclínicos
Grupo 3: Alérgicos no relacionados al polen del olivo	6	27 ± 16	50/50	16,6% Anafilaxia 16,6 % Reacción a picadura de insecto 33,3 % Asma/Rinitis 33,3 % Rinitis
Grupo 4: Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento	6	33 ± 11	83/17	100 % Asma/Rinitis
Grupo 5: Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia	6	28 ± 7	83/17	75% Asma/Rinitis 25% Rinitis

**Pruebas cutáneas positivas al extracto de Olea europaea, pero sin otros síntomas clínicos*

La Tabla 13 resume la identificación de las muestras estudiadas y sus características de extracción:

Tabla 13. Muestras de RNAs analizadas por microarrays de expresión génica

Pool RNA (1:1)	Sujeto 1	Sujeto 2	Grupo	Periodo	Concentración (ng/μl)
1	S1.7	G1.2	No alérgicos	Polinización	59,89
2	S1.7	G1.2		Fuera de la polinización	31,26
3	S1.1	J1.2		Polinización	38,44
4	S1.1	J1.2		Fuera de la polinización	54,36
5	S1.4	S1.5		Polinización	44,74
6	S1.4	S1.5		Fuera de la polinización	96,35
7	S2.1	-	Asintomáticos	Polinización	27,51
8	S2.1	-		Fuera de la polinización	26,075
9	S2.5	-		Polinización	49,09
10	S2.5	-		Fuera de la polinización	42,69
11	S2.9	-		Polinización	36,19
12	S2.9	-		Fuera de la polinización	35,67
13	J3.3	J3.5	Alérgicos no relacionados	Polinización	61,94
14	J3.3	J3.5		Fuera de la polinización	42,17
15	J3.4	J3.9		Polinización	49,95

16	J3.4	J3.9		Fuera de la polinización	31,68
17	G3.4	G3.3		Polinización	35,19
18	G3.4	G3.3		Fuera de la polinización	33,17
19	J4.6	J4.1	Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento	Polinización	34,53
20	J4.6	J4.1		Fuera de la polinización	49,42
21	J4.5	J4.8		Polinización	32,36
22	J4.5	J4.8		Fuera de la polinización	30,44
23	S4.5	G4.4		Polinización	22
24	S4.5	G4.4		Fuera de la polinización	32,88
25	J5.1	S5.4	Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia	Polinización	43,1
26	J5.1	S5.4		Fuera de la polinización	58,03
27	J5.5	G5.1		Polinización	28,92
28	J5.5	G5.1		Fuera de la polinización	32,89
29	G5.2	M5.2		Polinización	22,71
30	G5.2	M5.2		Fuera de la polinización	39,03

Codificación de los sujetos de estudio: Letra) G: Sujetos reclutados en el Hospital Universitario de Granada; S: sujetos reclutados en el Hospital Policlínico de Sevilla; J: sujetos reclutados en el Hospital General de Jaén; M: sujetos reclutados en el Hospital Civil de Málaga; Primer número) Grupo clínico al que pertenece el sujeto; Segundo número: número de paciente individual. Ejemplo: S1.7 → sujeto nº7 reclutado en el Hospital Policlínico de Sevilla perteneciente al grupo control (grupo 1)

Dos muestras fueron rechazadas debido a problemas técnicos (mala calidad del RNA): G3.4 y G3.3 durante y fuera de la polinización.

5.2. Análisis globales

El filtrado inicial eliminó aquellos *probesets* (pares de oligonucleótidos para un mismo gen) que tenían una señal menor de 100 en todos los microarrays.

Tras pasar los controles de calidad pertinentes, se generó una base de datos en la que se pueden visualizar las comparaciones de expresión diferencial de los genes, utilizando métodos paramétricos adecuados, en función del número de réplicas. Entre la información relevante que podemos encontrar en la base de datos se encuentra:

- ID: Identificador numérico de la sonda (propio de Affymetrix).
- Ratio: “*Fold change*” o valor del cambio para el gen analizado.
- p-value: Probabilidad de que el gen sea diferencialmente expresado por motivos aleatorios. Se escogerán aquellos genes con menor p-value., siendo el criterio de selección $p < 0,05$.
- Label: Se le asocia una etiqueta en función del valor de la columna Ratio. *Up-regulated* o sobre-expresado (si Ratio > 2), *Down-regulated* o reprimido (si Ratio < -2) y *Non-regulated* (si Ratio < 2 y > -2).
- Representative public ID: Número de acceso para la secuencia en la que se basa el *probeset*. Normalmente deriva de las bases GenBank, dbEST o RefSeq.
- Gene Symbol: Nombre oficial del gen derivado de diversas organizaciones. Affymetrix utiliza la base de datos UniGene.
- Uni Gene ID: Número de acceso de la secuencia en UniGene.

- *Entrez Gene*: Transcrito detectado de la base de datos del NCBI Entrez Gene.

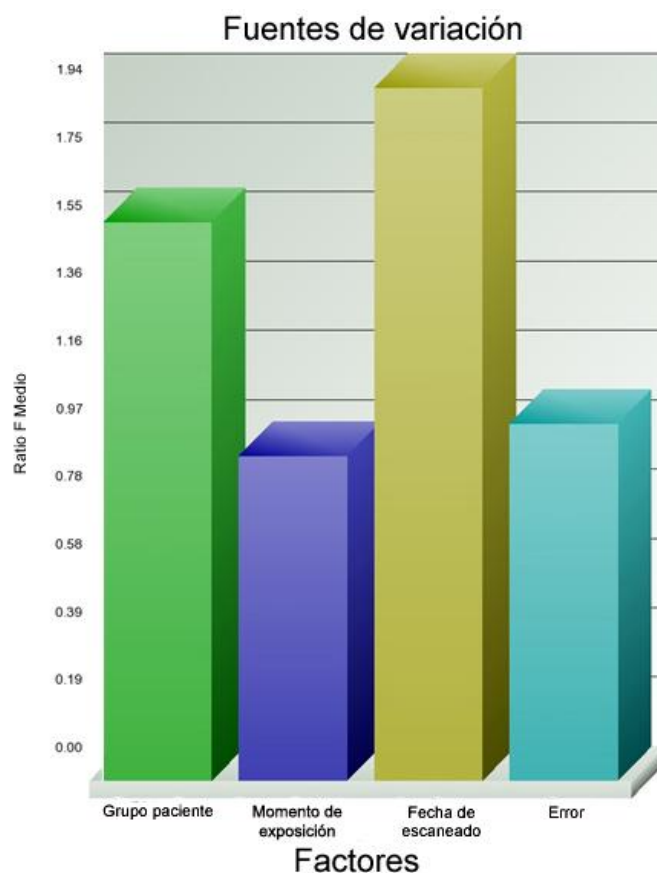
Todos los datos primarios sobre los que se discute en este trabajo han sido depositados en la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) del NCBI y son accesibles a través del siguiente número de acceso: GSE37157 y en la siguiente dirección web:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE37157>)

El primer análisis global de los datos fue un análisis de varianza entre los grupos, mediante el test estadístico ANOVA, con una corrección para modelos multivariantes (FDR: False Discovery Rate), con el fin de analizar las fuentes de variación frente al error del ANOVA. Este análisis identificó un total de 1746 transcritos diferencialmente expresados ($p < 0,05$) entre los diferentes grupos. El umbral del FDR fue del 5%.

Como se puede ver en la Figura 20, a nivel global, nos encontramos con que el factor que más variabilidad aporta al sistema es la “Fecha de escaneado” seguido de “Grupo de paciente” y por último “Momento de exposición”.

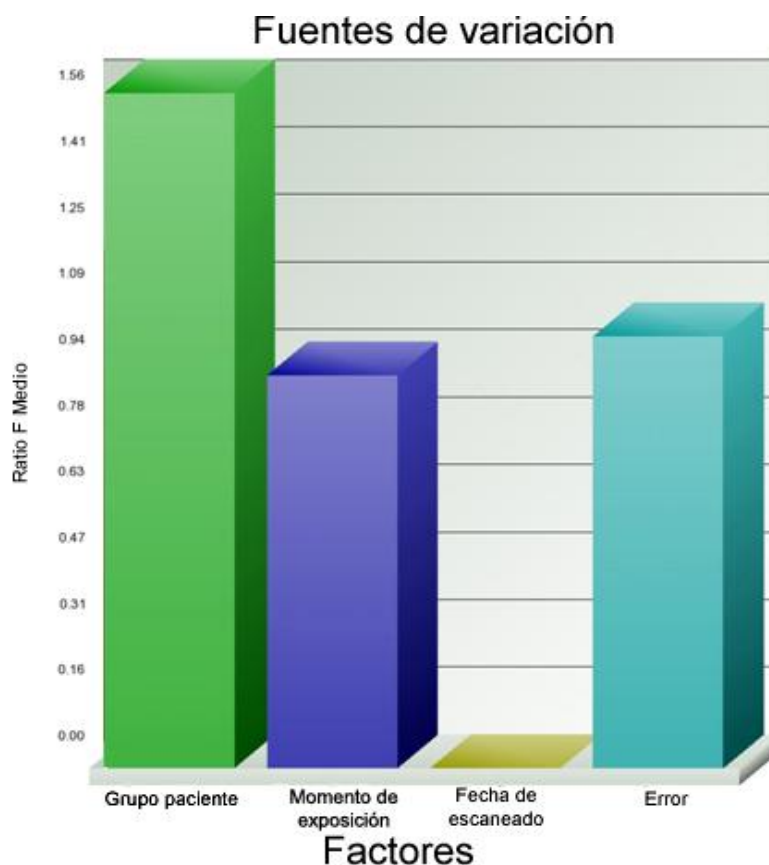
Figura 20: Análisis por ANOVA de fuentes de variación en el estudio



La gráfica refleja la relación de la varianza entre grupos y la varianza dentro del grupo (Eje Y: Ratio F medio) que informa de la variabilidad de los diversos factores (Eje X: Factores).

Para eliminar de las visualizaciones este factor (fecha de escaneado), utilizamos el BRE (*Batch Removal Effect*). Los llamados “*batch effects*” son fuentes de variación que ocurren durante el manipulado y que se deben a los diferentes “lotes” de muestras, ya que los microarrays utilizan muchas muestras que deben ser divididas en diferentes rondas para que el trabajo sea manejable. Si analizamos de nuevo las fuentes de variación, una vez eliminado este efecto, obtenemos lo que se refleja en la Figura 21.

Figura 21: Análisis de fuentes de variación, eliminando la fecha de escaneado

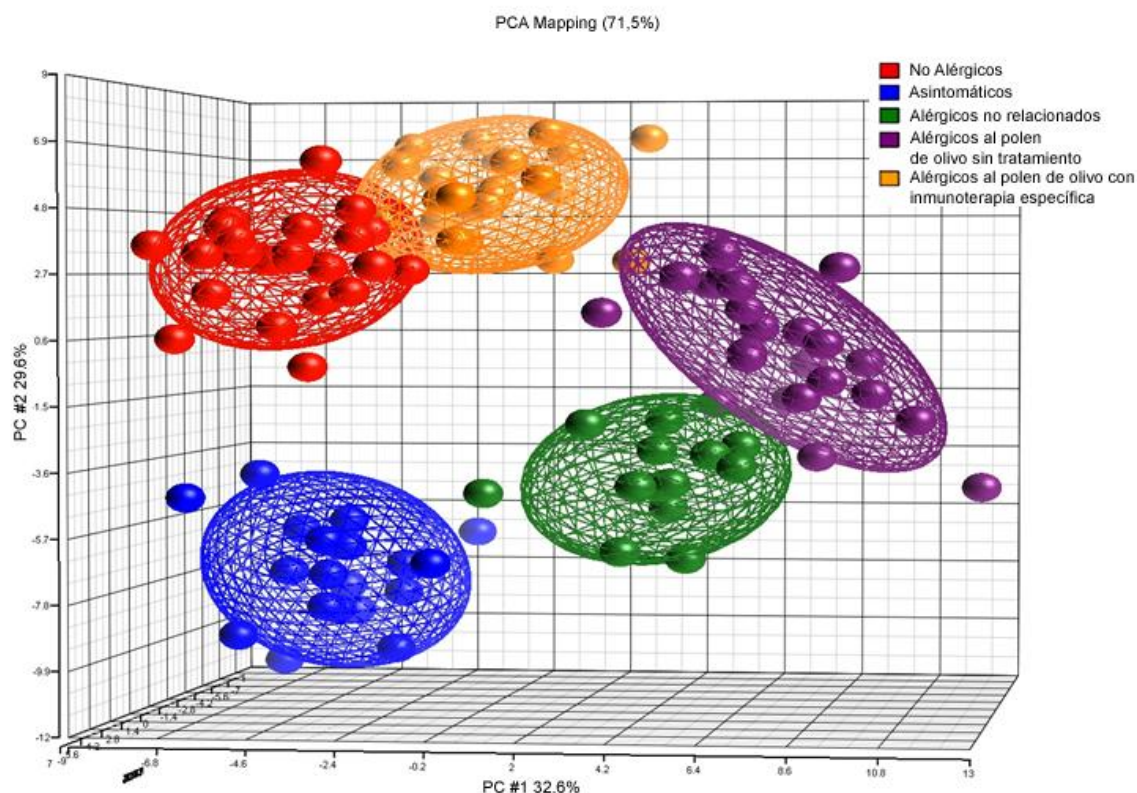


La gráfica refleja la relación de la varianza entre grupos y la varianza dentro del grupo (Eje Y: Ratio F medio) que informa de la variabilidad de los diversos factores (Eje X: Factores).

Por tanto, es el grupo al que pertenezca una determinada muestra, lo que induce la mayor variabilidad, mientras que el momento de exposición polínica, a nivel global, apenas aporta variabilidad, estando incluso por debajo del error.

El siguiente paso fue hacer un análisis para comprobar si era posible separar, en función de los datos, los distintos grupos experimentales. Para ello, se analizan los datos con PCA (*Principal Component Analysis*), donde se obtuvo una buena separación, tanto utilizando filtros de 0,05 como de 0,01, tal y como se observa en la Figura 22.

Figura 22. Análisis por PCA de separación de los grupos experimentales



Análisis no supervisado de la distribución de la expresión génica con los datos del microarray. Cada color indica el grupo clínico al que pertenece la agrupación. Los ejes de coordenadas representan los tres “componentes principales” que retienen la máxima variabilidad de los datos.

Como refleja la Figura 22, los genes definen agrupaciones que se corresponden con los grupos incorporados al análisis (cada color indica un grupo clínico distinto), lo que da coherencia al estudio, ya que el PCA es una herramienta de análisis no supervisado. Es decir, la técnica agrupa los datos en función de una distancia sin utilizar ningún tipo de información externa para organizar los grupos.

Estos interesantes resultados indujeron a pensar en la posibilidad de encontrar genes y /ó rutas diferenciales entre los cinco grupos clínicos que integran el estudio.

5.3. Análisis de la expresión génica diferencial entre grupos clínicos

El análisis de la expresión génica del genoma completo (47.000 transcritos y variantes, incluyendo 38.500 genes humanos bien caracterizados) fue realizado en 28 muestras de RNA (2 muestras fueron excluidas por razones técnicas).

Para obtener la expresión diferencial de los genes en función del grupo clínico al que pertenecen, se realizaron las siguientes comparaciones:

- 1) Grupo de sujetos No alérgicos (controles) durante el periodo de polinización frente a todos los demás grupos en el mismo periodo.
- 2) Grupo de sujetos Asintomáticos durante el periodo de polinización frente a todos los demás grupos en el mismo periodo
- 3) Grupo de sujetos Alérgicos no relacionados al polen de olivo durante el periodo de polinización frente a todos los demás grupos en el mismo periodo
- 4) Grupo de sujetos Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento durante el periodo de polinización frente a todos los demás grupos en el mismo periodo

- 5) Grupo de sujetos Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia específica durante el periodo de polinización frente a todos los demás grupos en el mismo periodo
- 6) Grupo de sujetos No alérgicos (controles) fuera del periodo de polinización frente a todos los demás grupos en el mismo periodo
- 7) Grupo de sujetos Asintomáticos fuera del periodo de polinización frente a todos los demás grupos en el mismo periodo
- 8) Grupo de sujetos Alérgicos no relacionados al polen de olivo fuera del periodo de polinización frente a todos los demás grupos en el mismo periodo
- 9) Grupo de sujetos Alérgicos al olivo sin tratamiento fuera del periodo de polinización frente a todos los demás grupos en el mismo periodo
- 10) Grupo de sujetos Alérgicos al olivo con inmunoterapia específica fuera del periodo de polinización frente a todos los demás grupos en el mismo periodo

Aunque se realizaron comparaciones entre ambos periodos de polinización, como ya se vio anteriormente, este dato no aporta demasiada variabilidad y por tanto no está incluido en los siguientes análisis.

El primer análisis diferencial de expresión génica que se realizó tras la normalización, sin corrección de múltiples test, identificó genes con una expresión diferencial entre los distintos grupos, que quedan resumidos en la Tabla 14. Este análisis preliminar fue realizado por Jesús García y Pedro Botías en el Departamento de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid.

Tabla 14. Análisis preliminar de genes diferencialmente expresados

Comparaciones entre grupos	Periodo: Durante la polinización		Periodo: Fuera de la polinización	
	Genes sobre-expresados/Genes reprimidos	*Genes intermedios	Genes sobre-expresados/Genes reprimidos	*Genes intermedios
Asintomáticos vs No Alérgicos	129/559	3475	93/564	1760
Alérgicos no relacionados vs No alérgicos	379/44	1329	156/39	1013
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs No Alérgicos	159/21	1668	317/87	1220
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs No Alérgicos	247/651	3661	112/145	988
Alérgicos no relacionados vs Asintomáticos	776/109	4529	1370/234	3828

Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Asintomáticos	1226/237	8189	1558/338	5107
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs Asintomáticos	227/200	1997	997/149	2935
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Alérgicos no relacionados	26/23	1441	38/197	1563
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs Alérgicos no relacionados	225/1030	4415	41/215	1796
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento	340/1365	7960	134/465	1943

*Genes con $p < 0,05$ pero Ratio menor del umbral asignado en el criterio de positividad (>2 ó <-2).

Así, para cada comparación se obtuvo un listado de genes sobre-expresados y reprimidos (*Fold Change* >2 y <-2 , con valores de $p < 0,05$).

Este tipo de análisis de expresión génica es muy complejo, fundamentalmente por la enorme cantidad de información que proporciona, motivo por el que para su correcto abordaje y adecuado rendimiento de la información, colaboramos con varios expertos bioinformáticos, el Dr. Manuel Mata del Departamento de Genómica del Hospital General Universitario en Valencia y con los Drs. David Montaner y Joaquín Dopazo del Departamento de Bioinformática de la Unidad de Genómica Funcional del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), en Valencia, que generaron las mismas comparaciones detalladas anteriormente, aunque en este caso realizando correcciones de múltiples test, obteniendo los valores de p ajustados, que poseen una restricción estadística mucho mayor que los *raw p values*.

La Tabla 15 resume los genes diferencialmente expresados con este segundo tipo de análisis, con valores de p ajustados $< 0,05$ y *Fold Change* >2 y <-2 .

Tabla 15. Expresión diferencial de genes entre los distintos grupos

Comparaciones entre grupos	Periodo: Durante la polinización		Periodo: Fuera de la polinización	
	Genes sobre-expresados/Genes reprimidos	Genes no diferenciados	Genes sobre-expresados/Genes reprimidos	Genes no diferenciados
Asintomáticos vs No Alérgicos	0/0	40610	329/224	40057
Alérgicos no relacionados vs No alérgicos	0/0	40610	2/0	40608
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs No Alérgicos	0/0	40610	1/0	40609
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs No Alérgicos	0/0	40610	0/0	40610
Alérgicos no relacionados vs Asintomáticos	0/0	40610	1059/1249	38302
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Asintomáticos	1/0	40609	1352/1676	37582
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs Asintomáticos	0/1	40609	331/469	39810
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Alérgicos no relacionados	0/0	40610	0/0	40610
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs Alérgicos no relacionados	0/0	40610	0/0	40610
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento	2/0	40608	0/1	40609

En la Tabla 15 se observa que esta corrección, que tiene por objeto controlar la cantidad de falsos positivos, ha provocado un descenso drástico del número de genes diferencialmente expresados, manteniéndose su número, principalmente, en las comparaciones frente al grupo asintomático fuera de la estación de polinización. Este análisis, realizado con correcciones de Benjamini-Hochberg (ver apartado de Materiales y Métodos 7.5.), establece el porcentaje de falsos positivos (el FDR, en este trabajo, del 5%) sobre el total de genes inicialmente identificados como expresados diferencialmente (Tabla 14). Este porcentaje es muy restrictivo y provoca, en numerosas ocasiones, un considerable incremento de falsos negativos (son genes que no aparecen como diferenciales, pero que realmente sí lo son). Es decir, la Tabla 15 refleja los genes obtenidos tras la corrección más restrictiva, a partir de la cual se hará todo el análisis funcional posterior. Sin embargo, pueden existir genes que han sido excluidos mediante este análisis, y que sean, en realidad, falsos negativos, y que pueden tenerse en cuenta en análisis posteriores utilizando un método de corrección menos restrictivo (aceptando un porcentaje de falsos positivos más alto, por ejemplo del 10%), o bien bajando el nivel de significación estadística (por ejemplo, usando un valor de p ajustado $< 0,1$).

Para determinar las implicaciones funcionales de la expresión génica diferencial, se llevaron a cabo dos análisis de enriquecimiento, por KEGG para caracterizar rutas diferenciales, y por Gene Ontology (GO) para procesos biológicos. Un total de 20 comparaciones se llevaron a cabo: 10 durante el periodo de polinización y otras 10 fuera de este periodo. El análisis se realizó para:

- **163** KEGG Pathways.
- **1411** términos de GO (Proceso Biológico).

A continuación se adjunta un resumen del número de vías funcionales KEGG con un enriquecimiento estadísticamente significativo entre los diferentes grupos de estudio. En el Anexo I pueden verse todas las rutas diferencialmente expresadas según la comparación.

Tabla 16. Resumen del análisis del enriquecimiento de vías funcionales (“KEGG pathways”)

Comparaciones	Durante la polinización		Fuera de la polinización	
	Vías reprimidas	Vías sobre-expresadas	Vías reprimidas	Vías sobre-expresadas
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs No Alérgicos	3	24	1	31
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Asintomáticos	3	23	1	34
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Alérgicos no relacionados	6	2	1	17

Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia	3	24	1	19
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs No Alérgicos	2	1	0	0
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs Asintomáticos	0	0	1	12
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs Alérgicos no relacionados	29	2	0	1
Asintomáticos vs No Alérgicos	3	4	2	1
Alérgicos no relacionados vs No alérgicos	1	21	3	7
Alérgicos no relacionados vs Asintomáticos	2	23	2	18

En general, las mayores diferencias se encontraron en los grupos de sujetos alérgicos y la mayoría de estas diferencias son vías y procesos biológicos sobre-expresados. En la Tabla 16 se aprecia cómo las mayores diferencias las presentan los pacientes alérgicos al polen de olivo no tratados frente a los sujetos no alérgicos o los sujetos asintomáticos, siendo en su mayoría rutas sobre-expresadas. Hasta 31 vías están sobre-expresadas fuera de la estación de polinización y 24 durante este periodo en la comparación de sujetos alérgicos al polen de olivo vs no alérgicos. Además, los pacientes alérgicos al polen de olivo tratados y los sujetos asintomáticos son los que menos diferencias muestran frente a los sujetos no alérgicos.

Este estudio también fue realizado para los términos GO. Esta base de datos está muy relacionada por la base de datos KEGG, y muchas de sus vías se correlacionan. KEGG se centra más en rutas metabólicas, mientras que GO cubre procesos celulares y funciones moleculares. Así, KEGG lista genes que parecen trabajar todos juntos y el equivalente GO suele contener una lista mayor de genes. A continuación se adjunta el enriquecimiento en términos GO.

Tabla 17. Resumen del análisis del enriquecimiento de procesos biológicos (“GO terms”)

Comparaciones	Durante la polinización			Fuera de la polinización		
	Vías reprimidas	Vías sobre-expresadas	No enriquecidas	Vías reprimidas	Vías sobre-expresadas	No enriquecidas
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs No Alérgicos	35	122	1254	3	129	1279
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Asintomáticos	46	130	1235	22	157	1232
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Alérgicos no relacionados	8	3	1400	7	11	1393
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia	35	146	1230	13	150	1248
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs No Alérgicos	25	3	1383	1	2	1408
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs Asintomáticos	1	0	1410	14	65	1332
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs Alérgicos no relacionados	147	18	1246	7	11	1393
Asintomáticos vs No Alérgicos	37	10	1364	60	9	1342
Alérgicos no relacionados vs No Alérgicos	7	121	1283	9	93	1309
Alérgicos no relacionados vs Asintomáticos	33	151	1227	31	129	1251

Los pacientes alérgicos al polen de olivo que han recibido tratamiento y los sujetos asintomáticos mostraron el menor número de vías y procesos biológicos diferenciales al compararlos con el grupo control de sujetos no alérgicos. Las comparaciones entre el resto de grupos mostraron un patrón diferencial de vías sobre-expresadas o reprimidas para cada una.

Para los procesos biológicos se ha realizado un filtrado de los términos redundantes. En cada comparación, la siguiente tabla muestra los términos de GO significativos y no redundantes:

Tabla 18. Resumen del análisis del enriquecimiento de procesos biológicos No redundantes

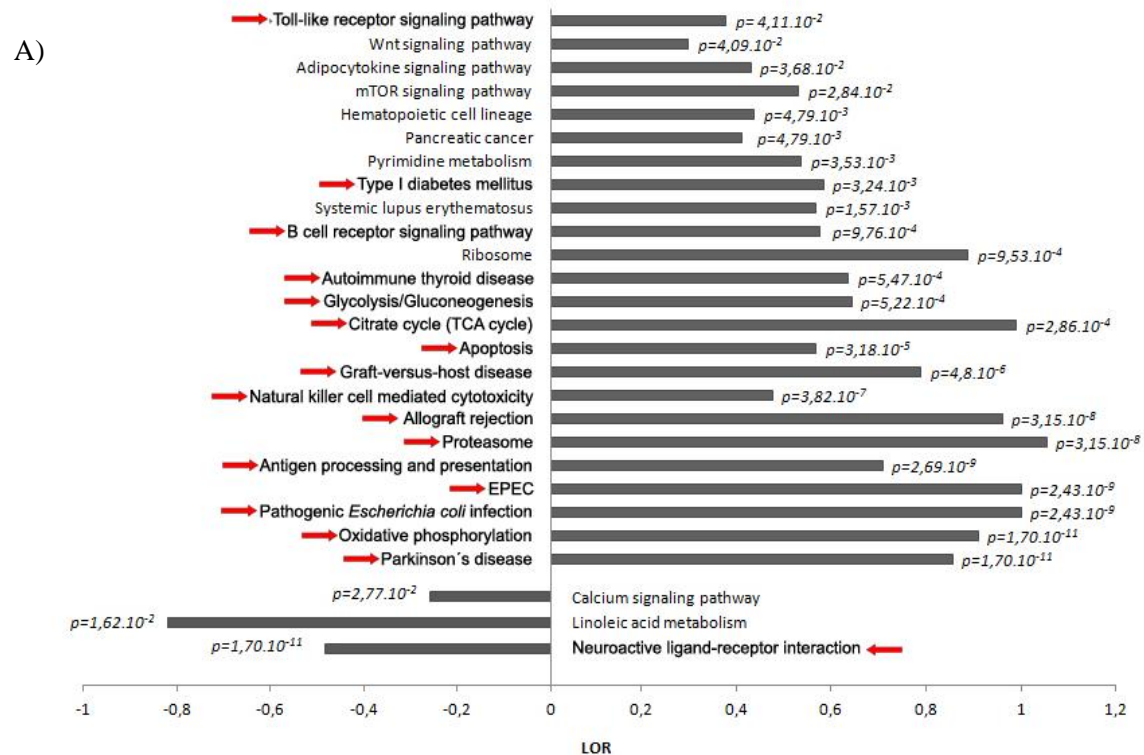
Comparaciones	Durante la polinización		Fuera de la polinización	
	Vías reprimidas	Vías sobre-expresadas	Vías reprimidas	Vías sobre-expresadas
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs No Alérgicos	21	62	3	64
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Asintomáticos	25	71	15	74
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Alérgicos no relacionados	5	3	6	9
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Alérgicos al olivo con inmunoterapia	21	81	9	65
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs No Alérgicos	16	2	1	2
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs Asintomáticos	1	0	11	32
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia vs Alérgicos no relacionados	73	13	50	18
Asintomáticos vs No Alérgicos	22	8	2	1
Alérgicos no relacionados vs No alérgicos	6	54	7	44
Alérgicos no relacionados vs Asintomáticos	21	79	20	56

Para cada una de las comparaciones se posee un fichero con la lista de los bloques funcionales significativos, su valor de p ajustado ($< 0,05$) y el *Log Odds Ratio* (LOR). LOR positivo indica que el bloque funcional está enriquecido para la primera condición. LOR negativo indica que el bloque funcional está enriquecido en la segunda condición.

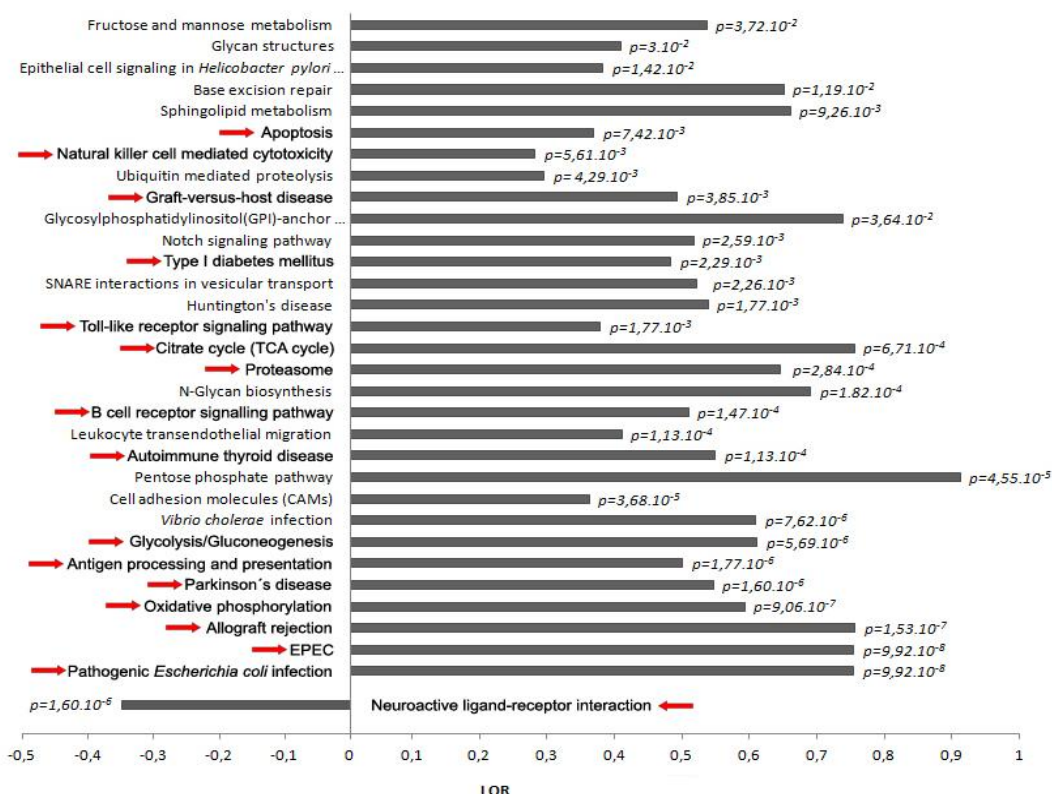
Para cada bloque funcional significativo de GO o de KEGG, también se obtiene una tabla con los identificadores de los genes que componen el bloque. Están ordenados según sus estadísticos y valores de p para cada una de las comparaciones de expresión diferencial correspondiente.

La Figura 23 muestra un ejemplo de las vías funcionales estadísticamente incrementadas y reprimidas en la comparación del grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento frente al grupo de sujetos no alérgicos durante los dos periodos de polinización. Los resultados se expresan en logaritmo de OR (LOR) y se muestra el valor de p ajustado de cada ruta. La totalidad de las vías diferencialmente expresadas según las comparaciones, puede consultarse en el Anexo I.

Figura 23. Vías funcionales diferenciales entre Alérgicos al polen de olivo y controles No alérgicos



B)

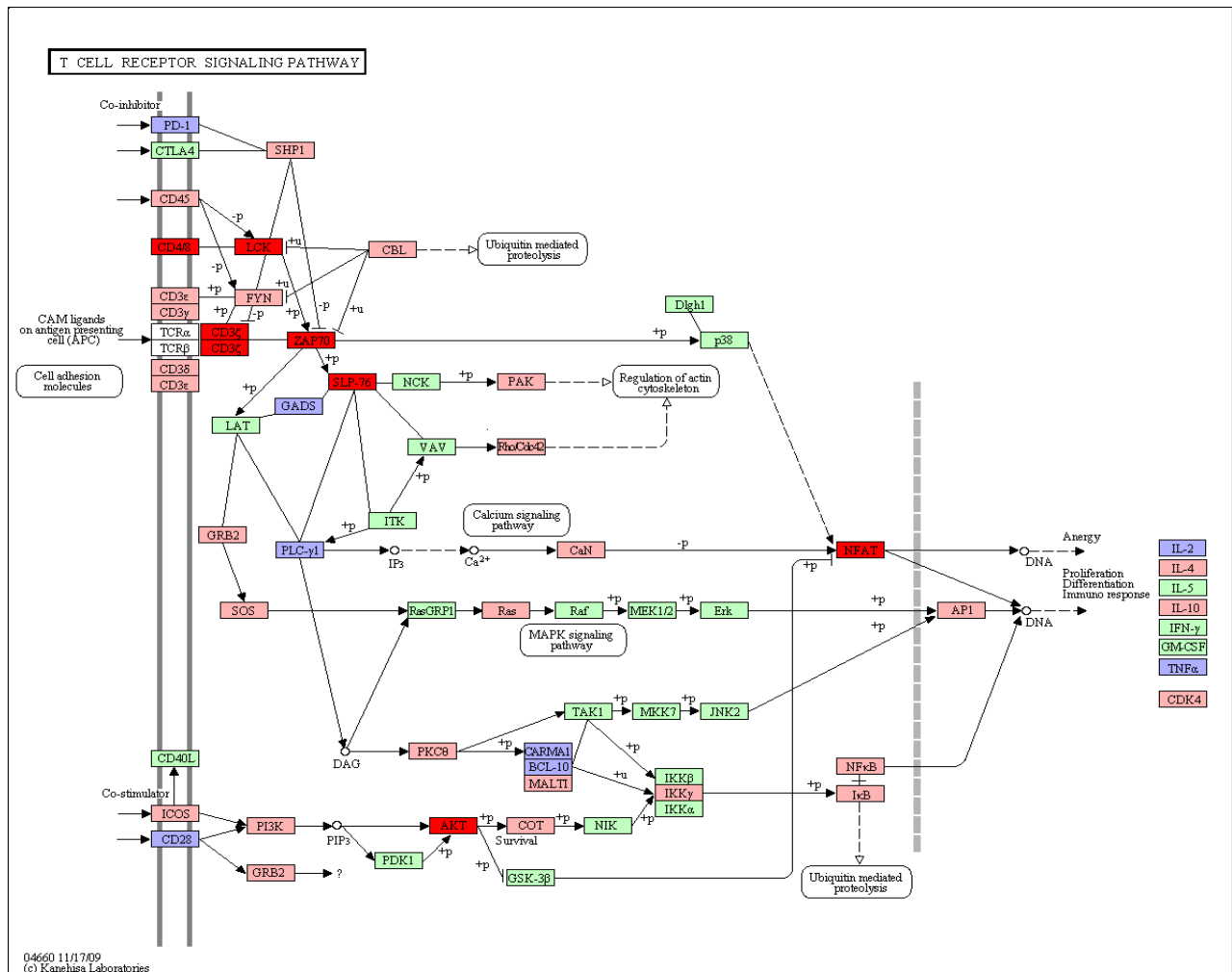


Vías diferenciales en la comparación de pacientes Alérgicos al polen de olivo y controles No alérgicos. Se indican los valores de p. LOR: Odds Ratio Logarithm. A) Durante el periodo de polinización; B) Fuera del periodo de polinización. Las flechas indican las vías comunes en ambos periodos de exposición.

En la base de datos, para las vías KEGG se incluye una representación gráfica. En estas imágenes los genes aparecen señalados en rojo y azul en tonos claro u oscuro. Los genes con tono oscuro son los diferencialmente expresados (valor p ajustado < 0,05), los genes en rojo son los sobre-expresados y los azules son los reprimidos. Los genes con color de tono claro no son diferencialmente expresados de forma significativa aunque el color indica el “sentido” de su diferencia de expresión. El color verde indica que no hay diferencias de expresión.

Las Figuras 24 y 25 muestran dos ejemplos, uno de vía estadísticamente incrementada y otro de vía estadísticamente disminuida. En el primer caso se ha escogido como ejemplo la vía de señalización del receptor de células T. Esta vía está incrementada en todos los grupos de sujetos alérgicos fuera del periodo de polinización cuando se compara frente al grupo de sujetos asintomáticos, mientras que durante la polinización, únicamente el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo sin inmunoterapia mantiene esta diferencia. Además, durante la polinización, el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo con tratamiento de inmunoterapia tiene esta ruta significativamente más reprimida que los grupos de sujetos no tratados y alérgicos no relacionados al polen de olivo. Esta vía incluye un amplio número de cascadas de señalización que determinan, en última instancia, la decisión de la célula en cuanto a producción de citocinas, supervivencia celular, proliferación y diferenciación.

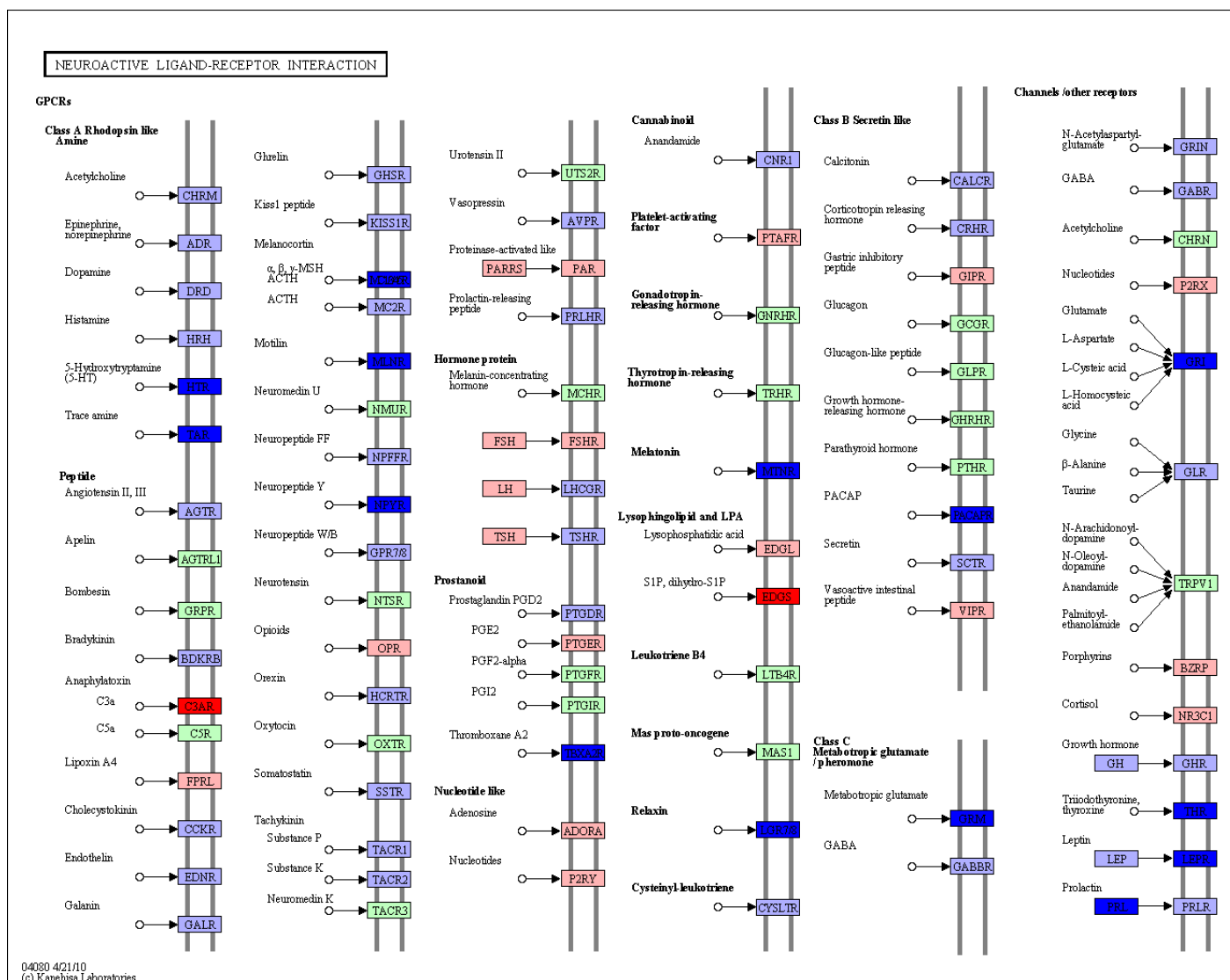
Figura 24. Ejemplo de vía diferencialmente incrementada (Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Asintomáticos)



Vía de la señalización del receptor de células T. Código de color: Rojo: gen sobre-expresado; Azul: gen reprimido; Verde: gen sin cambios. Color oscuro: cambio significativo. Color claro: cambio no significativo.

Como vía reprimida de forma estadísticamente significativa, se ha escogido como ejemplo la vía de interacción de los ligandos-receptores neuroactivos, una ruta KEGG interesante por estar repetidamente reprimida en el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo (sin embargo, está sobre-expresada en el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo con tratamiento de inmunoterapia). Esta ruta es especialmente atractiva ya que el modo en el que el sistema inmune y el nervioso colaboran para el control de la homeostasis y la defensa es un tema en plena exploración y que probablemente dará lugar a nuevas oportunidades terapéuticas.

Figura 25. Ejemplo de vía diferencialmente disminuida o reprimida (Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento vs Asintomáticos)



Vía de la interacción de ligandos y receptores neuroactivos. Código de color: Rojo: gen sobre-expresado; Azul: gen reprimido; Verde: gen sin cambios. Color oscuro: cambio significativo. Color claro: cambio no significativo.

Las enfermedades complejas, involucran múltiples vías y muchas de ellas comparten genes en común. Algunas de ellas relacionadas directamente con la respuesta inmune, como el procesamiento y la presentación antigénica, vías de señalización del receptor de células B, citotoxicidad mediada por células NK (*Natural Killer*), pero también hay otras rutas que aparentemente no parecen estar tan directamente relacionadas con la respuesta inmune, como la fosforilación oxidativa, apoptosis, ciclo del citrato, glicolisis/gluconeogénesis y el proteosoma. Es interesante señalar que la única ruta que posee un descenso significativo en los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento frente a los sujetos control (fuera de la polinización) es la vía de la interacción de los ligandos y receptores neuroactivos, una vía aparentemente no relacionada con la respuesta alérgica. Sin embargo, en nuestro estudio, es una de las vías reprimidas más recurrentes para los pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento. Durante la

polinización, otras dos vías, la señalización por calcio y el metabolismo del ácido linoleico, también están reprimidas en los pacientes alérgicos al olivo sin tratamiento.

Un resumen de los genes más relevantes encontrados en las comparaciones de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento frente al resto de grupos durante ambos periodos de exposición, agrupados por rutas, está reflejado en la Tabla 19. Se han señalado con colores, la tendencia general del gen o ruta concreta en las comparaciones (rojo: sobre-expresión; azul: represión).

Tabla 19. Genes relevantes en las comparaciones frente a pacientes alérgicos al polen de olivo no tratados

Genes relevantes	Rutas
<p>PIK3R, LCP2, CD48, LCK, CD247, ZAP70, NFATC3, KLRK1, PP3CC, SYK, PRKCB, IFNGR2, ITGAL, HLA-class I and II, CD8, CD40, AKT1, MAPK13, 14, TOLLIP, CD86, STAT1, NFKB1, PTPRC, RHOA, LYN, RASGRP3, PRKCB, CDR72, IFITM1, TAPBP, PSME3, CREB1, SELL, ITGB7, PECAM1, ITGB8, SCC2.</p> <p>IFNB1, MAPK11, MAPK10, RAET1E, SOS1, SH2D1B, ULPB1/B2, NCR2, NFATC1, KIR3DL1, BRAF, SHC3/C4, IFNAG, NCR2, PAK4, CDH2, CNTNAP2, NRCAM, NLGN1, CLDN19, NRXN1/N2, CLCN1, LICAM, SPN.</p>	<p>Ruta de señalización del receptor de células T</p> <p>Ruta de señalización del receptor de células B</p> <p>Asma</p> <p>Señalización FcεRI</p> <p>Procesamiento antigénico y presentación</p> <p>Interacción citocinas- receptor de citocinas</p> <p>Moléculas de Adhesión celular (CAMs)</p> <p>Ruta de señalización de la vía Toll-like</p> <p>Citotoxicidad mediada por células Natural Killer</p>
<p>SKP1, WWP1, PPIL2, ANAPC5, KLHL9, STUB1, ANAPC4, UBE2H, MCAM, SKP2, FBXW7, UBE3C, DDB2, CDC16, UBE2G2, UBE2D4, SIAH1, TRAF6, UBE2Q1, CUL3.</p> <p>HUWE1, MID1, PARK2, UBE2U, SMURF1, BTRC, CUL4A, PARK2, FBXW8, CUL4B, WWP1, TRIM37.</p>	<p>Proteólisis mediada por ubiquitinas</p>
<p>NFKB1, AIFM1, AKT1, PRKACA, BAX, PPP3CC, PIK3R1, BAD, CFLAR, APAF1, BCL2, PRKACB, PIK3R1, TNFRSF10B.</p>	<p>Apoptosis</p>
<p>S1PR5, C3AR1, VIPR1, FPR3.</p> <p>GRIA4, MC5R, GRM1, ADRA1A, NPBWR2, SSTR2, GABRP, MLNR, THRB, TAAR2, MC5R, HRH4, CRHR1, GPR83, GABRB3, GRIK2, NPY2R, MTNR1A, MC5R, TAC1, TBXA2R, RXFP1, ADCYAP1R1, LEPR, GRIA4, HTR1A, PRL, GRM5, PARD3, PPYR1, MLNR, BDKRB1, F2RL1, AGTR1, CSH2, GLRA3, CSH1, PRSS2, PTGER3, BDKRB2, RXFP1</p>	<p>Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos</p>

TBXA2R, GRM1, CACNA1C, ADRA1A, PDE1A, SLC8A1, AGTR1, ATP2B4, PTGER3, PLCB3, NOS2, BDKRB2, CACNA1A.

Ruta de señalización del calcio

TRPC1, ITPKB, CAMK2D, PRKACB.

SKP1, BUB3, CDKN1B, ATR, SMAD2, ORC5L, ANAPC5, ABL1, DBF4, YWHAB, ANAPC4, CDKN2C, MCAM, SKP2, MCM5, BUB3, CDC16, ORC2L, CDC14B, CDC25A, CDKN2A, CCNA2, CDKN1C, CDC14A, CDKN2C.

Ciclo celular

Genes y rutas de especial importancia en las comparaciones realizadas frente a los pacientes alérgicos al polen de olivo. El color indica la tendencia general de la vía o ruta (Rojo: Sobre-expresión; Azul: Represión).

5.4. Validación de la expresión génica por qRT-PCR

El siguiente paso fue la selección, a partir de los datos de microarrays, de los genes más significativos según los criterios detallados en Materiales y Métodos 8.1.

Se seleccionaron 93 genes para su análisis mediante otra técnica, qRT-PCR, en una población diferente a la utilizada por microarrays y seleccionada según los mismos criterios que la población inicial de estudio, utilizándose 80 muestras de RNA cuyas características clínicas y demográficas vienen resumidas en la Tabla 20.

Tabla 20. Características clínicas y demográficas de los sujetos seleccionados para la validación de genes

	N	Edad (años)	Periodo	Sexo (%) mujer/hombre	Diagnóstico clínico
Grupo 1: No alérgicos	8	34 ± 9,9	Durante la polinización	70/30	No Alérgicos
	10	39 ± 11	Fuera de la polinización	30/70	
Grupo 2: Asintomáticos*	10	33,6 ± 6.6	Durante la polinización	60/40	Subclínicos
	4	33,75 ± 9,9	Fuera de la polinización	75/25	
Grupo 3: Alérgicos no relacionados al polen del olivo	8	29,7 ± 8,1	Durante la polinización	50/50	25% Anafilaxia 12,5 % Reacción a picadura de insecto 37,5 % Asma/Rinitis 12,5 % Rinitis
	10	30 ± 8,5	Fuera de la polinización	30/70	10 % Anafilaxia 20% Reacción a picadura de insecto 30% Asma/Rinitis 30% Rinitis

Grupo 4: Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento	9	38,3 ± 16,09	Durante la polinización	77/33	33% Asma/Rinitis 77% Rinitis
	7	31,43 ± 11,6	Fuera de la polinización	85/15	57% Asma/Rinitis 43% Rinitis
Grupo 5: Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia	9	33,7 ± 11,9	Durante la polinización	77/33	85% Asma/Rinitis 15% Rinitis
	5	33,4 ± 14,9	Fuera de la polinización	80/20	80% Asma/Rinitis 20% Rinitis

**Pruebas cutáneas positivas al extracto de Olea europaea, pero sin otros síntomas clínicos.*

En la Tabla 21 se muestran las características de extracción y rendimiento de las muestras analizadas:

Tabla 21. Muestras seleccionadas para la validación de genes relevantes

Grupo	Período	Muestra	Ratio 260/280	Concentración µg/ml
No Alérgicos	Durante la polinización	G1.2	1,43	52,55
		J1.2	1,54	36,85
		S1.4	1,60	68,90
		S1.7	1,82	7,08
		S1.3	1,40	45,85
		S1.6	1,46	37,44
		M1.1	1,70	204,92
		J1.3	1,83	251,68
	Fuera de la polinización	J1.2	1,70	223,84
		S1.5	1,53	27,55
		S1.7	1,63	151,93
		J1.3	1,71	155,16
		M1.3	1,85	264,53
		M1.1	1,89	312,74
		S1.6	1,75	175,72
		S1.2	1,69	129,00
		J1.1	1,60	89,14
		G1.3	1,67	144,39
Asintomáticos	Durante la polinización	S2.1	1,5	41,27
		M2.3	1,48	86,88
		S2.5	1,57	33,92
		S2.7	1,70	35,77
		S2.2	1,55	86,71
		S2.9	1,65	166,26
		S2.4	1,61	198,86
		S2.6	1,39	647,41
		M2.1	1,62	135,91
		M2.2	1,49	54,19
	Fuera de la polinización	S2.1	1,52	52,15
		S2.9	1,51	99,59
		M2.3	1,53	96,62
		S2.5	1,53	29,54

Alérgicos no relacionados al polen de olivo	Durante la polinización	G3.3	1.57	57,95
		J3.9	1.52	61,95
		J3.3	1.77	36,54
		G3.8	1.55	81,87
		J3.7	1.82	237,3
		J3.6	1.63	82,95
		G3.10	1.67	147,94
		J3.5	1.67	47,01
		G3.4	1.60	112,17
	Fuera de la polinización	J3.3	1.52	45,87
		J3.9	1.53	36,89
		G3.3	1.52	45,87
		J3.2	1.55	30,36
		J3.7	1.58	52,84
		G3.6	1.73	188,8
		G3.8	1.69	153,57
		G3.9	1.60	112,17
		G3.10	1.81	245,85
Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento	Durante la polinización	S4.5	1.45	39,76
		J4.6	1.62	34,18
		S4.2	1.54	93,02
		S4.3	1.54	51,14
		S4.4	1.57	88,04
		S4.6	1.65	183,75
		J4.7	1.58	61,46
		J4.2	1.80	227,37
		J4.4	1.90	329,09
	Fuera de la polinización	J4.8	1.66	39,20
		S4.5	1.75	208,1
		J4.6	1.60	30,00
		G4.7	1.69	141,96
		J4.4	1.67	136,37
		J4.2	1.72	182,03
		G4.5	1.75	208,1
Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia	Durante la polinización	J5.1	1.48	51,38
		J5.5	1.66	104,85
		G5.3	1.59	142,62
		G5.4	1.60	37,72
		J5.4	1.76	14,7
		M5.2	1.64	126,09
		G5.5	1.55	92,21
		S5.1	1.52	108,21
		S5.5	1.67	195,27
	Fuera de la polinización	J5.5	1.39	41,1
		G5.3	1.51	38,3
		G5.1	1.85	32,67
		M5.2	1.67	150,46
		G5.2	1,65	116,4

Codificación de los sujetos de estudio: Letra) G: Sujetos reclutados en el Hospital Universitario de Granada; S: sujetos reclutados en el Hospital Policlínico de Sevilla; J: sujetos reclutados en el Hospital General de Jaén; M: sujetos reclutados en el Hospital Civil de Málaga; Primer número) Grupo clínico al que pertenece el sujeto; Segundo número: número de paciente individual. Ejemplo: S1.7 → sujeto nº7 reclutado en el Hospital Policlínico de Sevilla perteneciente al grupo control (grupo 1).

Durante el experimento algunas muestras mostraron un perfil de expresión muy bajo y se eliminaron del análisis posterior: durante la polinización los sujetos S2.5,

G3.10, G3.3 y S4.3; fuera del periodo de polinización los sujetos M1.1, M1.3, M2.3, S2.1, S2.5, S2.9 y J4.4.

Se diseñaron tarjetas microfluídicas de 384 pocillos (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) para el análisis de la expresión génica por qRT-PCR (Tabla 22) de los 93 genes seleccionados como diferencialmente expresados junto a 3 endógenos. La elección de los genes endógenos que actúan como controles internos es muy importante, ya que, en general, los genes endógenos lo son en determinados tejidos o poblaciones, considerándose también más fiable el uso de más de un gen endógeno. Para nuestras placas microfluídicas seleccionamos tres genes endógenos comúnmente utilizados con PBMCs: 18S, GAPDH y β 2 microglobulina.

Tabla 22. Genes seleccionados para validación por qRT-PCR

	Símbolo	Descripción	Otros nombres	Localización cromosómica
1	LCK	Tirosín quinasa específica de linfocitos	LSK; YT16; p56lck; pp58lck	1p34.3
2	CD48	Molécula CD48	BCM1; BLAST; hCD48; mCD48; BLAST1; SLAMF2; MEM-102; CD48	1q21.3-q22
3	CD247	Molécula CD247	T3Z; CD3H; CD3Q; CD3Z; TCRZ; CD3-ZETA	1q22-q23
4	PTPRC	Tirosín fosfatasa, receptor tipo C	LCA; LY5; B220; CD45; T200; CD45R; GP180	1q31-q32
5	SELL	Selectina L	RP1-117P20.1	1q23-q25
6	ZAP70	Quinasa asociada a la cadena Z (TCR) 70kDa	SRK; STD; TZK; ZAP-70; FLJ17670; FLJ17679	2q12
7	STAT1	Activador de la transcripción y transductor de la señal 1 91kDa	ISGF-3; STAT91; DKFZp686B04100	2q32.2
8	CD86	Molécula CD86	FLJ33531; IL-1RAcPIP; TOLLIP	3q21
9	NFKB1	Factor nuclear 1 del activador génico de la cadena kappa ligera en células B	KBF1; p105; EBP-1; MGC54151; NFKB-p50; NF-kappaB; NFKB-p105; NF-kappa-B; DKFZp686C01211	4q24p50
10	LCP2	Proteína citosólica de linfocitos 2	SLP76; SLP-76	5q33.1-qter
11 a 13	Genes de HLA: DRB1, DQB1 Y DPB1	Complejo HLA		6p
14	MAPK13	Quinasa 13 activada por mitógenos	SAPK4; PRKM13; MGC99536; p38delta	6p21.31
15	TAPBP	Proteína de unión a TAP (tapasina)	TPN; TAPA; TPSN; NGS17; TAPBP	6p21.3
16	ITGB8	Integrina, beta 8		7p21.1
17	LYN	Oncogén homólogo relacionado con v-yes-1 Sarcoma viral	JTK8; FLJ26625	8q13

		de Yamaguchi		
18	TOLLIP	Proteína de interacción con Toll	FLJ33531; IL-1RAcPIP	11p15.5
19	ITGB7	Integrina, beta 7		12q13.13
20	AKT1	v-akt Homólogo de oncogén viral del timo murino	AKT; PKB; RAC; PRKBA; MGC99656; PKB-ALPHA; RAC-ALPHA	14q32.32
21	NFATC3	Factor nuclear citoplasmático de células T activadas dependiente de calcineurina 3	NFAT4; NFATX	16q22.2
22	PRKCB	Proteína quinasa C, beta	PKCB; PRKCB1; PRKCB2; MGC41878; PKC-beta; PRKCB23.	16p11.2
23	ITGAL	Integrina alfa L (antígeno CD11A (p180), antígeno 1 asociado a función de linfocitos; polipéptido alfa [<i>Homo sapiens</i>]	CD11A; LFA-1; LFA1A	16p11.2.
24	PECAM1	Molécula de adhesión endotelial/plaquetaria	CD31; PECAM-1; FLJ58394	17q23
25	CD40	Molécula CD40, Receptor de la superfamilia TNF miembro 5	p50; Bp50; CDW40; MGC9013; TNFRSF5	20q12-q13.2
26	MAPK11	Quinasa activada por mitógeno 11	P38B; SAPK2; p38-2; PRKM11; SAPK2B; p38Beta; P38BETA2	22q13.33
27	SOS1	Proteína homóloga 1 <i>son of sevenless</i> , (<i>Drosophila</i>)	GF1; HGF; NS4; GGF1; GINGF	2p22-p21
28	RAET1E	Tránsito temprano del ácido retinoico 1E	LETAL; ULBP4; RAET1E2; MGC125308; MGC125309; bA350J20.7; RAET1E. chromosome: 6	6q25.1
29	NCR2	Receptor activador de la citotoxicidad natural 2	LY95; CD336; NKP44; NK-p44; dJ149M18.1	6p21.1
30	IFNB1	Interferón beta 1 de fibroblastos	IFB; IFF; IFNB;. MGC96956	9p21
31	SPN	Sialoforina	LSN; CD43; GPL115	16p11.2
32	CDH2	Caderina 2, tipo 1, N-caderina (neuronal)	CDHN; NCAD; CD325; CDw325	18q11.2
33	NFATC1	Factor nuclear citoplasmático de células T activadas dependiente de calcineurina 1	NFAT2; NFATc; NF-ATC; MGC138448	18q23
34	KIR3DL1	Receptor de células NK similar a inmunoglobulinas, tres dominios, cola citoplasmática larga	KIR; NKB1; NKAT3; NKB1B; CD158E1 MGC119726; MGC119728; MGC126589; MGC126591	19q13.4
35	SKP1	Quinasa asociada a la fase S 1	OCP2; p19A; EMC19; SKP1A; OCP-II; TCEB1L; MGC34403; SKP1	5q31
36	WWP1	Dominio WW de la E3 proteína ubiquitina ligasa 1	AIP5; Tiul1; hSDRP1; DKFZp434D2111	8q21
37	MCAM	Molécula de adhesión de células de melanoma	CD146; MUC18	11q23.3
38	SMURF1	Proteína ubiquitina ligasa 1 específica de SMAD E3	KIAA1625	7q22.1

39	TRIM37	Motivo que contiene tripartito 37	MUL; POB1; TEF3; KIAA0898	17q23.2
40	CUL4B	culina 4B	SFM2; MRXSC; MRXHF2; KIAA0695; DKFZp686F1470	Xq23
41	PRKACB	Proteína quinasa, dependiente de AMPc, subunidad catalítica beta [<i>Homo sapiens</i>]	r PKACB; MGC9320; MGC41879; DKFZp781I2452;	1p36.1.
42	APAF1	Factor apoptótico 1 activador de peptidasa	CED4; APAF-1; DKFZp781B1145	12q23
43	PRKACA	Proteína quinasa, dependiente de AMPc, subunidad catalítica alfa	PKACA; MGC48865; MGC102831	19p13.1
44	BAX	Proteína X asociada a BCL2	BCL2L4	19q13.3-q13.4
45	C3AR1	Receptor 1 del componente del complemento 3a	AZ3B; C3AR; HNFAG09	12p13.31
46	S1PR5	Receptor 5 de esfingosina-1-fosfato	EDG8; S1P5; Edg-8; SPPR-1; SPPR-2	19p13.2
47	FPR3	Receptor 3 de formil-péptidos	FMLPY; FPRH1; FPRH2; FPRL2; RMLP-R-I; FML2_HUMAN	19q13.3-q13.4
48	PTGER3	Receptor 3 de prostaglandina E (subtipo EP3)	EP3; EP3e; EP3-I; EP3-II; EP3-IV; EP3-III; MGC27302; MGC141828; MGC141829	1p31.2
49	LEPR	Receptor leptina	OBR; CD295	1p31
50	THRB	Receptor de hormona tiroidea, subunidad beta (homólogo 2 de oncogén viral de leucemia eritroblástica (v-erb-a))	GRTH; PRTH; THR1; ERBA2; NR1A2; THRB1; THRB2; ERBA-BETA; MGC126109; MGC126110	3p24.2
51	PRL	Prolactina		6p22.2-p21.3
52	TAC1	Taquikinina, precursor 1	NK2; NPK; NKNA; TAC2; Hs.2563	7q21-q22
53	ADRA1A	Receptor adrenérgico, alfa-1	ADRA1C; ADRA1L1; ALPHA1AAR	8p21-p11.2
54	PARD3	Homólogo de par-3 (<i>C. elegans</i>)	Baz; ASIP; PAR3; PARD3A; Bazooka; SE2-5T2; FLJ21015; SE2-5L16; SE2-5LT1; PAR3alpha	10p11.21
55	GRM5	Receptor metabotrópico de glutamato 5	mGlu5; GPRC1E; MGLUR5	11q14.2-q14.3
56	GPR83	Receptor acoplado a proteína G 83	GIR; GPR72	11q21
57	BDKRB1	Receptor de bradikina B1	B1R; BKR1; B1BKR; BKB1R; BRADYB1	14q32.1-q32.2
58	CRHR1	Receptor 1 liberador de corticotropina	CRF1; CRHR; CRF-R; CRFR1; CRHR1L; CRHR1f; CRH-R1h	17q12-q22
59	HRH4	Receptor de histamina H4	H4; H4R; BG26; HH4R; AXOR35; GPRv53; GPCR105; MGC133027	18q11.2
60	TBXA2R	Receptor tromboxano A2	TXA2-R; TBXA2R	19p13.3
61	PDE1A	Fosfodiesterasa 1A, calmodulina-dependiente HCAM1	HSPDE1A; MGC26303	2q32.1
62	IL-4	Interleucina 4	BSF1; IL-4; BCGF1; BCGF-1; MGC7940	5q31.1
63	IL-5	Interleucina 5	EDF; TRF	5q31.1

64	IL-13	Interleucina 13	ALRH; BHR1; P600; IL-13; MGC116786; MGC116788; MGC116789	5q31
65	IL-10	Interleucina 10	CSIF; TGIF; IL-10; IL10A; MGC126450; MGC126451	1q31-q32
66	IFN-g	Interferón, gamma [<i>Homo sapiens</i>]	IFG; IFI; IFNG	12q14
67	FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>	JM2; AIID; IPEX; PIDX; XPID; DIETER MGC141961; MGC141963	Xp11.23
68	TGFB	Factor de crecimiento transformante beta 1	19q13.1. CED; LAP; DPD1; TGFB; TGFBeta	19q13.2
69	IL-17	Interleucina 17	IL17; CTLA8; IL-17; IL-17A	6p12
70	IL4R	Receptor de interleuquina 4	IL-4 receptor subunit alpha; IL-4R subunit alpha; IL-4R-alpha; IL-4RA	16p12.1-p11.2
71	IL13RA1	Receptor de interleuquina 13 subunidad alfa 1	CD213a1 antigen; CT19; IL-13 receptor subunit alpha-1; IL-13R subunit alpha-1; IL-13R-alpha-1; IL-13RA1; IL13 receptor alpha-1 chain;	Xq24
72	IQUB	Proteína que contiene un motivo IQ y un dominio de ubiquitina	IQ and ubiquitin-like domain-containing protein	7q31.32
73	GZMH	Granzima H (proteína h-CCPX similar a catepsina G 2)	cathepsin G-like 2; cytotoxic T-lymphocyte proteinase	14q11.2
74	EPC1	Potenciador 1 de homólogo de proteínas <i>polycomb</i>	enhancer of polycomb 1; enhancer of polycomb homolog	10p11
75	VCAN	Versican	chondroitin sulfate proteoglycan 2	5q14.3
76	CRTAP	Proteína asociada a cartílago	cartilage-associated protein; leprecan-like 3	3p22.3
77	MSR1	Receptor <i>scavenger</i> (barredor) de macrófagos 1		8p22
78	FCER1A	Receptor de alta afinidad de Fc de IgE I, polipéptido alfa	Fc IgE receptor, alpha polypeptide; Fc epsilon RI alpha-chain; Fc-epsilon RI- alpha	1q23
79	TAAR2	Receptor asociado a señal de amina 2	G protein-coupled receptor 58; G-protein coupled receptor 58	6q24
80	ADRB1	Receptor adrenérgico, beta-1	beta-1 adrenergic receptor; beta-1 adrenoceptor; beta-1 adrenoreceptor	10q24-q26
81	PTGER2	Receptor de prostaglandina E 2 (subtipo EP2), 53kDa [<i>Homo sapiens</i>]	EP2; PTGER2	14q22
82	TLR4	Receptor <i>toll-like</i> 4	homolog of Drosophila toll	9q33.1
83	NFIB	Factor nuclear I/B [<i>Homo sapiens</i>] NFIB2	NFIB3; NFI-RED; HMGIC/NFIB	9p24.1
84	TRD	Receptor delta de células T [<i>Homo sapiens</i>]	TRD; TCRD; TCRDV1; FLJ52034; FLJ52576; FLJ53668; FLJ54555; FLJ55265; FLJ56790	14q11.2
85	GRIK1	Receptor ionotrópico de glutamato, kainato 1 [<i>Homo sapiens</i>]	EAA3; EEA3; GLR5; GLUR5	21q22.11
86	NLRP3	Familia NLR, dominio que contiene pirina 3 [<i>Homo sapiens</i>]	AII; AVP; FCU; MWS; FCAS; CIAS1; NALP3; C1orf7; CLR1.1; PYPAF1; AII/AVP; AGTAVPRL; FLJ95925	1q44
87	TAGAP	Proteína activadora de células T activada por RhoGTPasa [<i>Homo sapiens</i>]	FKSG15; IDDM21; TAGAP1; FLJ32631; FLJ39771; MGC27381; MGC133247	6q25.3

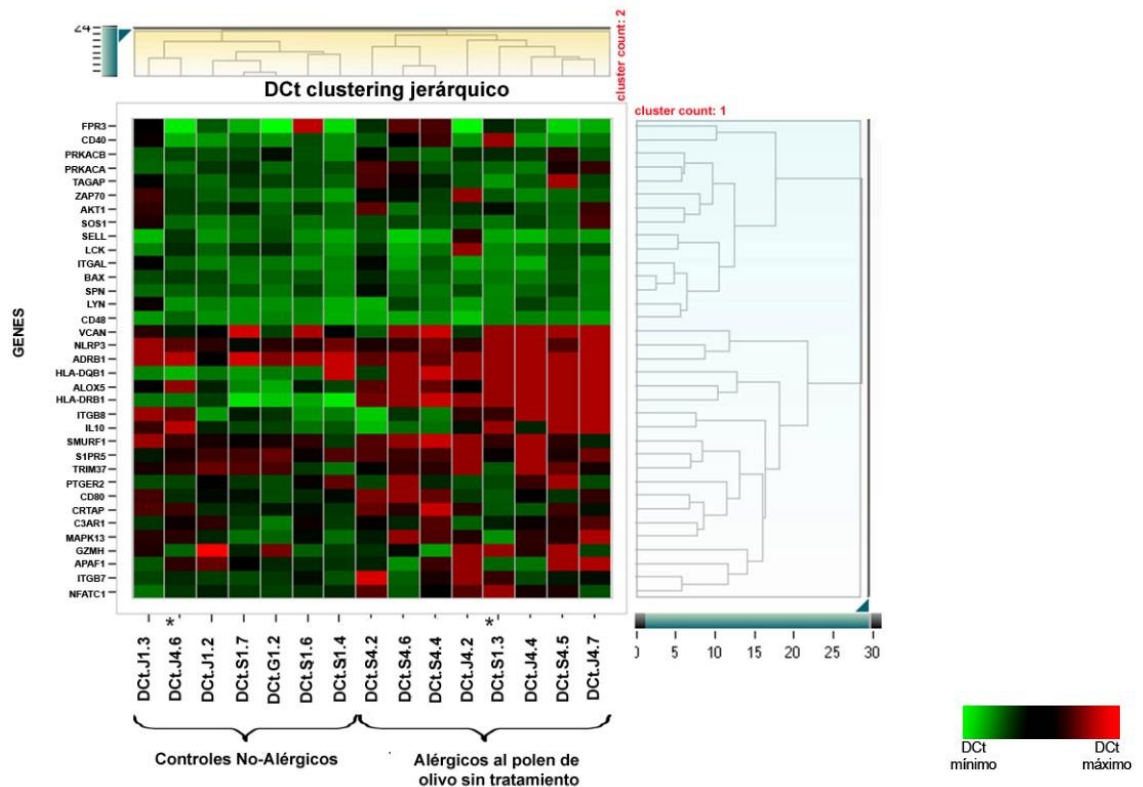
88	CLEC2B	Dominio de lectina tipo C familia 2, miembro B [<i>Homo sapiens</i>]	AICL; IFNRG1; CLECSF2; HP10085	12p13-p12
89	PTX3	Pentraxina 3, larga [<i>Homo sapiens</i>]	SG-14; TNFAIP5	3q25
90	ADAM32	Metalopeptidasa ADAM dominio 32		8p11.22
91	ALOX5	Araquidonato 5-lipooxigenasa [<i>Homo sapiens</i>]	5LPG; LOG5; 5-LOX; MGC163204	10q11.2
92	SULF1	Sulfatasa 1	HSULF-1; FLJ30905; FLJ38022; FLJ41750; KIAA1077;	8q13.1
93	VNN1	Vanina 1 [<i>Homo sapiens</i>]	HDLCQ8; Tiff66; MGC116930; MGC116931; MGC116932	6q23-q24

Los datos obtenidos del análisis de expresión génica diferencial de estos 93 genes entre los grupos analizados revelaron que 35 genes se confirman como diferencialmente expresados: ADRB1, AKT1, ALOX5, APAF1, BAX, CD40, CD48, CD86, C3AR1, CRTAP, FPR3, GZMH, HLA-DRB1, HLA-DQB1, IL-10, ITGAL, ITGB7, ITGB8, LCK, LYN, MAPK13, NFTAC1, NLRP3, PRKACA, PRKACB, PTGER2, S1PR5, SELL, SMURF1, SOS1, SPN, TAGAP, TRIM37, VCAN y ZAP70.

Utilizamos un modelo jerárquico para clasificar las muestras de acuerdo a la expresión de estos 35 genes, encontrando que este modelo era capaz de distinguir entre los pacientes con alergia al polen de olivo que no tenían tratamiento y los sujetos no alérgicos en muestras recogidas durante la polinización.

Como podemos ver en la siguiente gráfica de “*heat-map*”, las diferencias entre el grupo de sujetos alérgicos al olivo y el de sujetos no alérgicos se definen claramente con la expresión de estos 35 genes en nuestra población de estudio.

Figura 26. Gráfica “Heat-map” (Alérgicos al polen de olivo no tratados vs No Alérgicos durante la polinización)



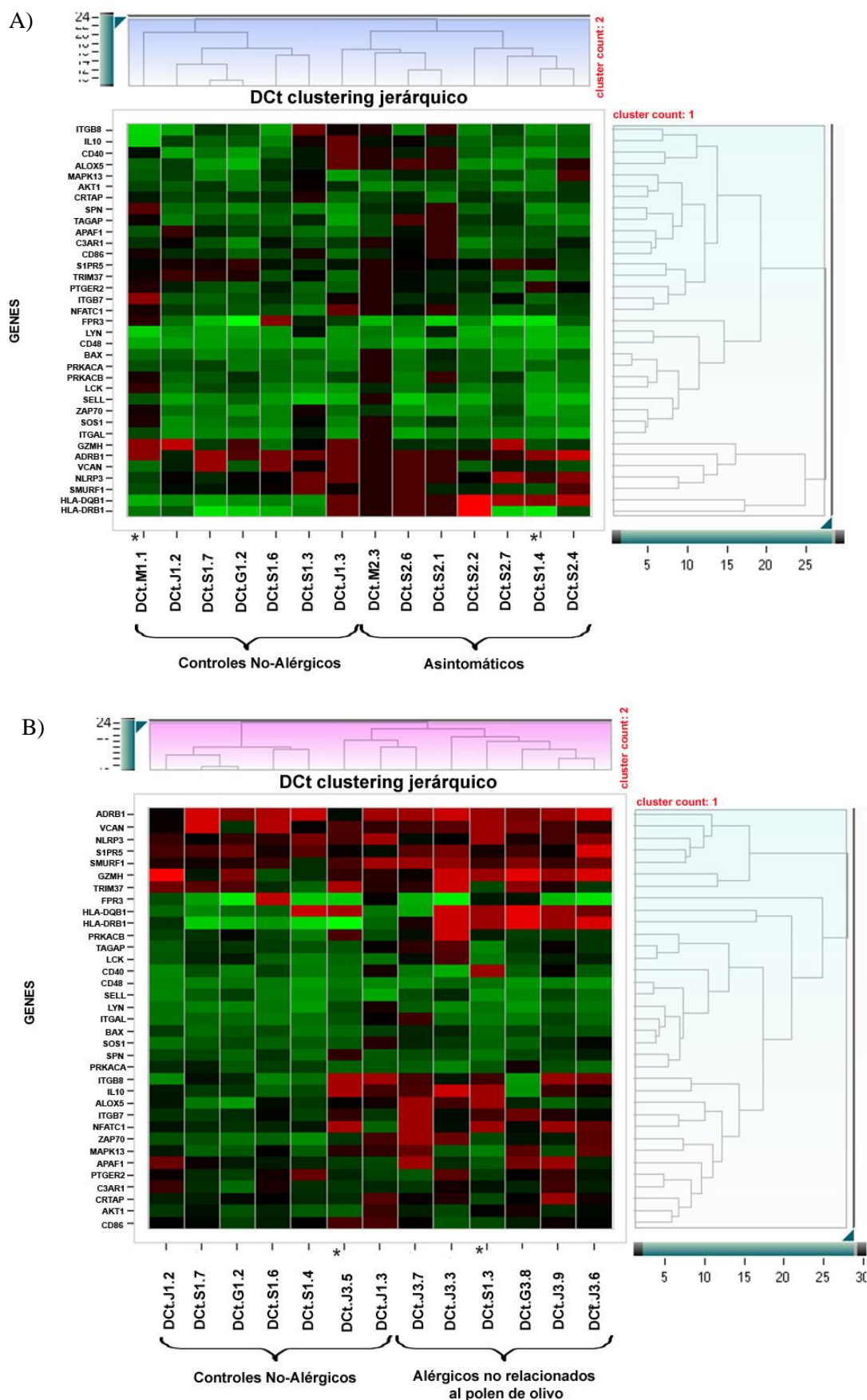
*Análisis de la expresión génica de los 35 genes diferencialmente expresados para la comparación de pacientes Alérgicos al polen de olivo no tratados frente a sujetos No Alérgicos durante la polinización. Los árboles jerárquicos indican la similitud de los datos entre sí (arriba: sujetos; derecha: genes). Rojo: valor máximo de ΔC_t . Verde: valor mínimo de ΔC_t . *Indica los sujetos que no corresponden al grupo, clasificados según el análisis no supervisado.*

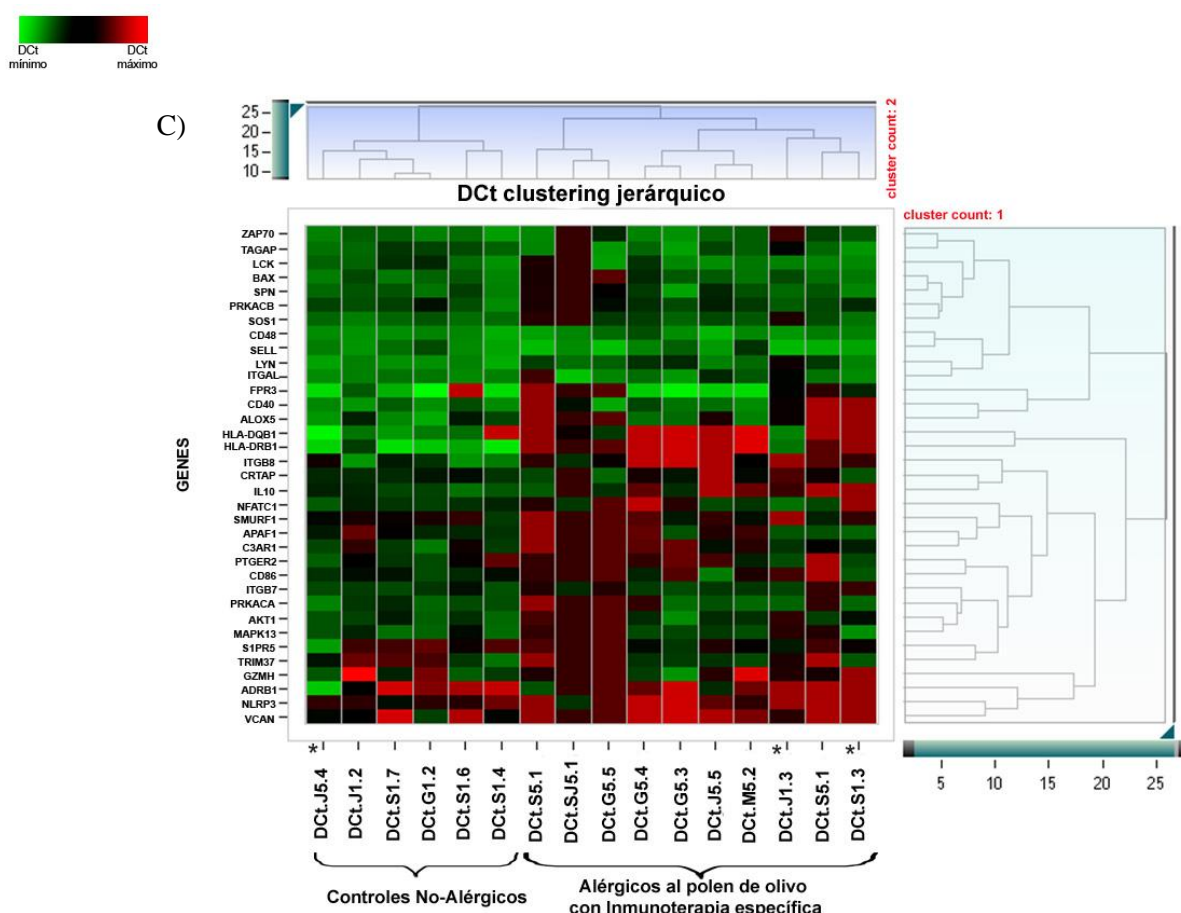
La separación entre los dos grupos de sujetos mostró una sensibilidad del 88% y una especificidad del 87,5%. De los quince sujetos analizados, sólo un paciente alérgico al polen de olivo y un control sano no fueron correctamente clasificados.

En esta comparación (análisis no supervisado, que agrupa los datos en función de similitud), el análisis de expresión génica de estos sujetos permite estratificar claramente dos grupos diferenciados: sujetos no alérgicos (Grupo 1) y sujetos alérgicos al polen de olivosin tratamiento (Grupo 4). Este conjunto de genes diferenciales agrupan a los pacientes a un lado y a los sanos a otro, permitiendo separarlos fácilmente. Estos resultados parecen definir un perfil molecular diferencial de respuesta.

Estos mismos 35 genes, aunque lógicamente con una distribución de la expresión génica diferente, cuando son analizados con el mismo modelo no supervisado son capaces de discriminar entre los sujetos no alérgicos y el resto de grupos de nuestro estudio en muestras recogidas durante la polinización: sujetos asintomáticos vs sujetos no alérgicos (sensibilidad del 87,5 % y especificidad del 87,5%), pacientes alérgicos no relacionados al polen de olivo y sujetos no alérgicos (sensibilidad 85,7% y especificidad del 87,5%) y pacientes alérgicos al polen de olivo con tratamiento de inmunoterapia vs sujetos no alérgicos (sensibilidad 90 % y especificidad 77,7 %). Estos resultados se muestran en la Figura 27.

Figura 27. Gráficas “Heat-map”: comparaciones de distintos grupos clínicos vs controles No Alérgicos





Análisis de la expresión génica de los 35 genes diferencialmente expresados para las comparaciones frente a sujetos No Alérgicos durante la polinización: A) Asintomáticos; B) Alérgicos no relacionados al polen de olivo; C) Alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia específica. Los árboles jerárquicos indican la similitud de los datos entre sí (arriba: sujetos; derecha: genes). Rojo: valor máximo de ΔCt . Verde: valor mínimo de ΔCt . * Indica los sujetos que no corresponden al grupo, clasificados según el análisis no supervisado.

Estos interesantes resultados abren la posibilidad de discriminar, con un único set de genes, el grupo de sujetos sanos frente al resto de condiciones clínicas, incluyendo a los sujetos asintomáticos.

Este grupo de genes, sin embargo, no es capaz de diferenciar todos los grupos entre sí, así como diferenciar entre muestras extraídas durante la polinización y fuera de este periodo. Los restantes *heat-maps* realizados pueden consultarse en el Anexo I.

5.5. Análisis funcional de los genes validados por qRT-PCR

Este grupo de 35 genes fueron reanalizados desde un punto de vista funcional usando la base de datos DAVID para definir las rutas en las que están involucrados. Este análisis mostró siete agrupamientos principales: activación celular, adhesión celular, respuesta inflamatoria, apoptosis, ruta de señalización de MAPK, interacción de ligandos y receptores neuronales, proteólisis mediada por ubiquitinas y un grupo final clasificado como miscelánea, con dos genes (CRTAP y TAGAP) que nunca antes han sido relacionados con las enfermedades alérgicas (Tabla 23).

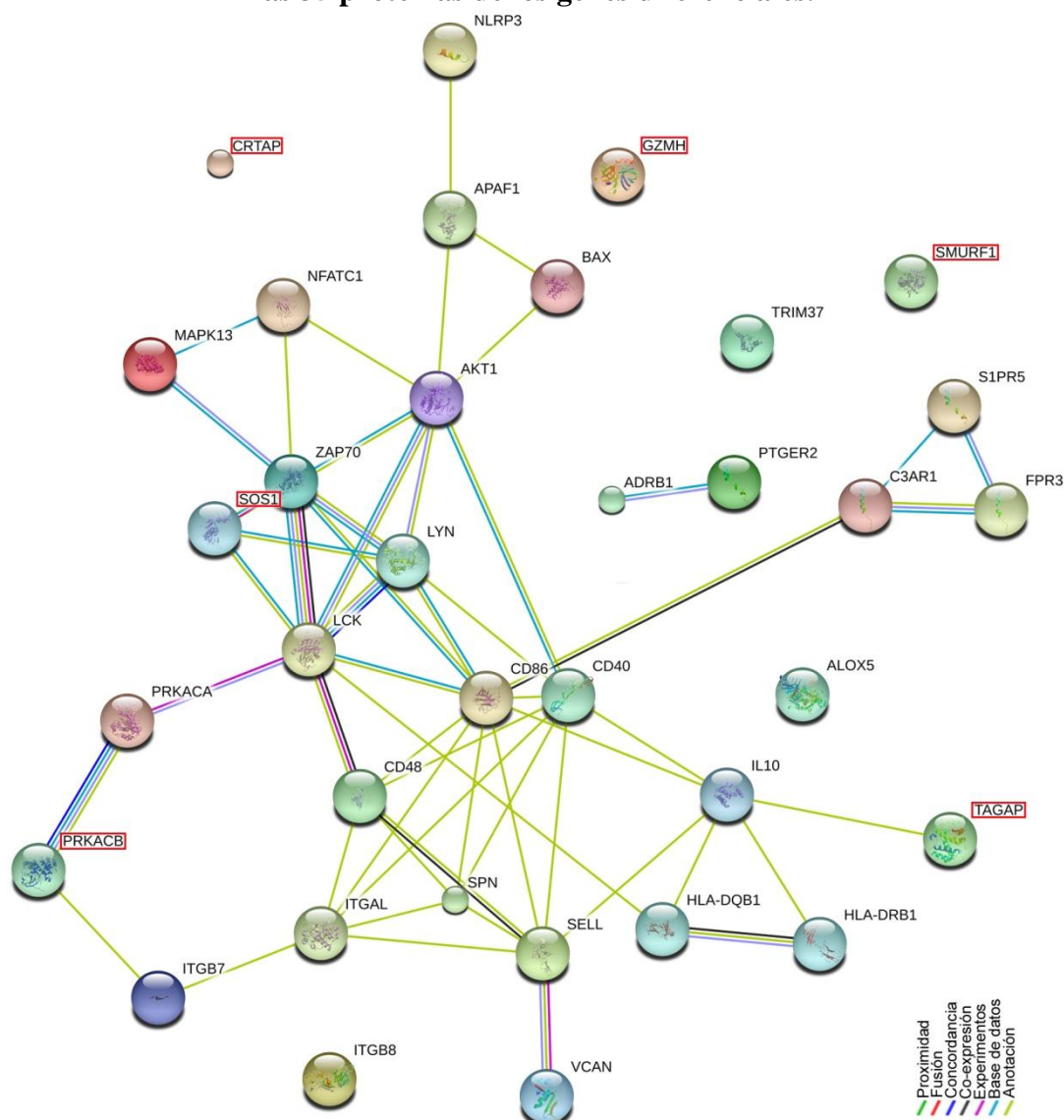
Tabla 23. Clasificación funcional de genes mediante el programa DAVID

Agrupamiento funcional	Genes
Activación celular	CD86, CD40, CD48, HLA-DRB1, HLA-DQB1, IL10, NFATC1, LCK, SPN, LYN, ZAP70, ITGAL, BAX.
Moléculas de adhesión celular	SELL, VCAN, ITGAL, ITGB7, ITGB8, CD40, CD86, HLA-DRB1, HLA-DQB1
Respuesta inflamatoria	CD40, ALOX5, IL10, LYN, C3AR1, ITGAL, AKT1
Apoptosis	BAX, APAF1, PRKACA, <u>PRKACB</u> , AKT1, NLPR3, <u>GZMH</u>
Ruta de señalización MAPK	MAPK13, PRKACA, PRKACB, <u>SOS1</u> , AKT1
Interacción ligando-receptor neuroactivos	ADRB1, C3AR1, FPR3, PTGER2, S1PR5
Proteólisis mediada por ubiquitinas	<u>SMURF1</u> , TRIM37
Miscelánea	<u>CRTAP</u> , <u>TAGAP</u>

Los genes subrayados nunca antes han sido relacionados con enfermedades alérgicas.

Así mismo, se utilizó la base de datos STRING para determinar la relación entre las proteínas codificadas por los 35 genes (Figura 28).

Figura 28. Imagen obtenida con la base de datos STRING: red de interacción para las 35 proteínas de los genes diferenciales.



La red resume las asociaciones según el programa STRING para las 35 proteínas codificadas por los 35 genes diferenciales encontrados. Las líneas representan las asociaciones, diferenciadas por 7 colores: Proximidad: Genes que aparecen cerca en el genoma; Fusión: eventos de fusión genómica; Concordancia: presencia o ausencia de proteínas relacionadas en varias especies; Co-expresión: genes que se expresan al mismo tiempo en la misma o en otras especies (transferidos por homología); Experimentos: listado de interacciones proteicas a partir de otras bases de datos de interacciones proteína-proteína; Base de datos: listado de interacciones de grupos de proteínas extraídos de bases de datos; Anotación: listado de interacciones de grupos de proteínas extraídos de sinopsis de la literatura científica. Las proteínas en recuadro rojo nunca antes se han relacionado con enfermedades alérgicas.

El análisis nos muestra un núcleo central de genes, fundamentalmente relacionado con el sistema inmune. Estos genes incluyen genes muy relacionados con enfermedades alérgicas pero también otros que nunca se habían relacionado con este tipo de respuestas. Así mismo, la vía de la interacción de ligandos y receptores neuroactivos también presenta un pequeño agrupamiento unido al núcleo de genes relacionados con el sistema inmunitario. Algunos genes no presentan interacciones proteicas conocidas (aunque sí se conoce en la mayoría de los casos a qué ruta funcional pertenecen), y aparecen dispersos y sin uniones a otros genes.

DISCUSIÓN

Las investigaciones de décadas pasadas han dejado claro que en las enfermedades alérgicas juega un papel fundamental la regulación alterada de la respuesta celular. La alergia es un modelo de respuesta Th₂ (mediado por IL-4, IL-5 e IL-13) en la que es esencial la respuesta humoral B para la secreción de anticuerpos IgE específicos. Pero aún quedan preguntas básicas por contestar, ¿cuál o cuáles son los agentes que inician y/o facilitan esta respuesta anómala Th₂?, ¿por qué frente a la misma exposición antigénica ambiental unas personas se vuelven alérgicas, mientras que otras no?.

Respuesta humoral

La noción de que el tipo de respuesta humoral se divide en anticuerpos IgG e IgE, tiene una larga tradición en alergología. En este trabajo, con el fin de definir perfiles diferenciales de respuesta humoral entre 5 grupos clínicos (sujetos no alérgicos, sujetos asintomáticos, alérgicos no relacionados con el polen de olivo, alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia), se analizaron los niveles séricos de anticuerpos relacionados con la respuesta alérgica, IgE total e IgE específica, así como de anticuerpos no inflamatorios, IgA e IgG4 específicos, en dos momentos de exposición (durante y fuera del periodo de polinización) (Figura 12, página 72).

Los resultados mostraron que los sujetos asintomáticos presentaban los mayores niveles de IgE sérica total, independientemente del momento de exposición, seguidos de los pacientes alérgicos tratados con inmunoterapia, con niveles muy altos, y de los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y alérgicos no relacionados, con niveles altos. Respecto a los niveles de anticuerpos IgE específicos a polen de olivo, fueron muy elevados en el grupo de sujetos alérgicos a polen de olivo tanto tratados como sin tratar, comparado con los grupos de controles sanos y sujetos alérgicos no relacionados con el polen de olivo (con niveles indetectables o muy bajos) y con los sujetos asintomáticos (con niveles bajos). Aunque los anticuerpos IgE específicos suelen estar asociados a la respuesta alérgica, hay que destacar que su presencia no equivale a enfermedad, sino que puede indicar una sensibilización, como ocurre en el grupo de sujetos asintomáticos, que aunque poseen niveles detectables de anticuerpos, no muestran sintomatología asociada.

Recientemente, se ha demostrado que calcular el ratio de los niveles séricos de IgE específica y de IgE total puede ser muy útil en la predicción de la respuesta a la inmunoterapia. (Di Lorenzo, G. y cols., 2009). En nuestro estudio (Figura 13, página 75), esta relación diferencia los pacientes alérgicos a polen de olivo (tratados o no) del resto.

La relación existente entre los niveles de IgE total y de IgE específica puede tener diferentes interpretaciones. Una posible explicación sería que el aumento de IgE total puede ser resultado de la sensibilización al alérgeno, con el consiguiente aumento de IgE específica (Kerkhof, M. y cols., 1996). Otra posibilidad es que los altos niveles de IgE indiquen una activación general del sistema inmune, originando un aumento del riesgo de sensibilización a los antígenos específicos (Oryszcyn, M.P. y cols., 1995).

Los anticuerpos IgG4 e IgA, al contrario que los de isotipo IgE, inician respuestas no inflamatorias. Un sistema inmune “normal” responde a alérgenos con anticuerpos IgG4 e IgA y no posee niveles detectables de IgE específicos. De hecho, la inmunoterapia está asociada con un incremento de anticuerpos IgG4 (Till, S.J. y cols., 2004, Wachholz, P.A. y cols., 2004). Estos anticuerpos no activan al complemento, no tienen actividad inflamatoria y se postula que actúan como anticuerpos bloqueantes, compitiendo por los sitios de unión de IgE a los mastocitos, basófilos y otras células. De hecho, se ha descrito que los anticuerpos IgG4 inducidos por inmunoterapia bloquean la liberación de histamina dependiente de IgE por los basófilos (García, B.E. y cols., 1993) y suprimen las

respuestas T específicas de alérgenos *in vitro*, inhibiendo la unión de la IgE a las células presentadoras (van Neerven, R.J. y cols., 1999, Wachholz, P.A. y cols., 2003).

En este estudio, los mayores niveles de anticuerpos IgA específicos al polen de olivo se encontraron en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo con tratamiento, independientemente del periodo de exposición, aunque también el grupo de pacientes no tratados mostró niveles elevados. Sin embargo, el dato más significativo fue la presencia de niveles muy altos de anticuerpos IgG4 en los pacientes alérgicos al polen de olivo con tratamiento comparado con el resto de los grupos. Los resultados globales, tanto de IgE como de IgG4 específica en los pacientes tratados, indican que la inmunoterapia produce un aumento de IgG4 específica sin disminuir los niveles de IgE específica y por tanto, la principal diferencia respecto a los pacientes no tratados, no radica en una disminución de los anticuerpos IgE específicos, sino en el gran incremento de anticuerpos IgG4.

Para visualizar mejor los resultados, la Figura 13 representa los ratios de diferentes anticuerpos específicos. El análisis global de los ratios de anticuerpos específicos IgE/IgG4, IgG4/IgA e IgE/IgA muestra que los grupos control y de alérgicos no relacionados al polen de olivo tienen una respuesta específica baja. Los sujetos asintomáticos muestran una respuesta específica intermedia y los grupos de pacientes alérgicos al polen de olivo con y sin inmunoterapia tienen, como es esperable, la respuesta específica más alta, aunque sus ratios reflejan diferencias interesantes: el grupo de sujetos alérgicos sin tratamiento tiene una relación de anticuerpos IgE/IgG4 mucho más alta (entre 6 y 10 veces según el periodo de exposición polínica) que los pacientes alérgicos al polen de olivo tratados, debido esencialmente a la gran diferencia en los niveles de IgG4.

En numerosos estudios, la inmunoterapia induce un aumento de anticuerpos IgG4 y un incremento temporal de anticuerpos IgE específica en suero, seguido por un descenso gradual de IgE que dura meses u años (Gleich, G.J. y cols., 1982, Durham, S.R., Till, S.J., 1998), si bien el incremento de los anticuerpos IgG4 es más pronunciado, provocando un descenso de entre 10 y 100 veces del ratio IgE/IgG4 de los pacientes tratados (Jutel, M. y cols., 2003, Akdis, C.A. y cols., 2004a). Una posible explicación es que un exceso de IgG4 bloquea los antígenos impidiendo que estimulen a los linfocitos B y por tanto, inhibiendo la producción de anticuerpos IgE (Wachholz, P.A., 2003, Shamji, M.H. y cols., 2011). Sin embargo, esta disminución en los niveles de IgE no siempre aparece o bien lo hace relativamente tarde en el tratamiento (Moed, H. y cols., 2013, Kong, W. J. Chen y cols., 2012). Otra explicación de porqué los anticuerpos IgG4 se vuelven prominentes sólo durante una exposición antigénica crónica podría relacionarse con el nivel de proliferación celular. Las células plasmáticas tienen un nivel proliferativo menor (Brinkmann, V., Heusser, C.H., 1993), por lo que la producción de IgE, podría deberse mayoritariamente a células plasmáticas de larga duración con un potencial proliferativo pequeño, como se ha demostrado en modelos murinos (Holt, O.G. y cols., 1984, Holt, P.G., Leivers, S., 1983). Esto podría explicar la disparidad de efectos de la inmunoterapia sobre los niveles de IgE e IgG4 específica.

En resumen, los resultados de este estudio, no confirman mayores niveles de los anticuerpos específicos no inflamatorios (IgG4 y IgA) en los sujetos no alérgicos frente al polen de olivo, pero sí un incremento en los niveles de anticuerpos no inflamatorios (sobre todo en los anticuerpos IgG4) en pacientes alérgicos a polen de olivo tratados con inmunoterapia específica, aunque sin afectar a los niveles de anticuerpos IgE específicos.

Respuesta celular

En las enfermedades alérgicas, la implicación de las células T tiene un papel esencial. El equilibrio entre Th₁, Th₂, Treg, y Th₁₇ puede ser uno de los determinantes

más relevantes para el tipo de respuesta producida. Por ello, para caracterizar posibles perfiles celulares diferenciales de respuesta entre los cinco grupos clínicos del estudio, se analizaron los niveles en suero de un panel de citocinas representativas de distintos tipos celulares: citocinas Th₂ (IL-5, IL-4, IL-13 e IL-9), Th₁ (IFN- γ), Treg (IL-10, TGF- β), IL-17 y TNF- α , durante y fuera del periodo de polinización.

Aunque la mayoría de los valores medios de las citocinas estudiadas no varió según el grupo clínico ni la exposición polínica, esta falta de diferencias en la “síntesis espontánea” no quiere decir que no puedan existir diferencias en la “capacidad de producir citocinas” en condiciones de estimulación. Además, este estudio, como muchos otros (Gabrielsson, S. y cols., 2001, Kurt, E. y cols., 2010, Moverare, R. y cols., 2000a), se ha realizado en muestras de sangre periférica, por tanto, se puede especular que las células diferenciadas a Th₂ están situadas preferentemente en los tejidos inflamados, dando la falsa impresión de que las células sanguíneas tienen una baja capacidad de producir citocinas tales como IL-4 o IL-5.

Sin embargo, el análisis del porcentaje de sujetos con niveles detectables de citocinas IL-4 e IL-5 (Figura 14, página 79) reveló algunas diferencias interesantes. Para IL-4, prácticamente todas las condiciones del estudio mostraron altos porcentajes de sujetos con niveles detectables, exceptuando el grupo asintomático fuera de la época de polinización. De manera interesante, este mismo grupo durante la polinización presenta un 100% de sujetos con niveles detectables, siendo la diferencia entre periodos, significativa. En global, los datos de la literatura sugieren que la citocina IL-4 es esencial en el desarrollo inicial y expansión de las respuestas tipo Th₂, con la generación de anticuerpos IgE (Coyle, A.J., y cols., 1995, Rankin, J.A., y cols., 1996) pero no en la fase efectora de la respuesta (Lewis, C.C. y cols., 2009). El grupo de sujetos asintomáticos es un grupo interesante ya que presenta sensibilización al alérgeno (presenta anticuerpos IgE específicos al polen de olivo además de una alta cantidad de IgE total) pero no sintomatología. Este fenotipo intermedio entre sujetos controles y alérgicos podría responder a altas concentraciones del alérgeno durante la polinización mediante IL-4, provocando altas concentraciones de IgE que podrían mantenerse fuera del periodo de polinización, pero con mecanismos reguladores que les permiten controlar la sintomatología y los niveles de IL-4 fuera de la estación polínica.

Respecto a IL-5, los grupos de sujetos alérgicos tienen más pacientes con niveles detectables durante la polinización que fuera de este periodo, de forma estadísticamente significativa. Parece existir una relación entre un aumento de pacientes con niveles detectables de IL-5 y la exposición al polen de olivo, incluso para los pacientes alérgicos no relacionados. IL-5 está relacionada con la inflamación y el reclutamiento de eosinófilos (Gleich, G.J., 2000) y tiene una regulación diferente que IL-4, pudiendo presentarse inflamación eosinofílica inducida por alérgenos en ausencia de IgE (Togias, G., 2000, Bottcher, M.F., 2003). Un nivel extremadamente alto de carga polínica podría provocar inflamación o la presencia de IL-5 en sujetos atópicos que ya presenten desviación hacia una respuesta Th₂.

Los valores medios de citocinas (con la excepción de TGF- β) tampoco reflejan cambios debido a la inmunoterapia. La inmunoterapia podría estar alterando la respuesta local Th₂ en la mucosa nasal hacia una respuesta Th₁, aunque existe controversia acerca de si estos cambios son detectables en sangre periférica. Hay artículos que concluyen que los cambios observados en los niveles de citocinas a nivel local tras inmunoterapia, no se reflejan en las muestras de sangre periférica. (Wachholz, P.A. y cols., 2002, Hamid, Q.A., 1997, Klimek, L. y cols., 1999, Moverare, R. y cols., 2000a, Klimek, L. y cols., 1999, Moverare, R. y cols., 2000b), mientras que otros demuestran que sí (Ebner, C. y cols., 1997, Benjaponpitak, S. y cols., 1999). Estudios realizados en pacientes sensibilizados al

veneno de abeja sugieren que la inmunoterapia induce un estado de respuesta reducida de las células T, acompañada de cambios en la producción de citocinas (Akdis, C.A. y cols., 1996, Akdis, C.A. y cols., 1998, Akdis, C.A., Blaser, K., 1999). Sin embargo, este tipo de sensibilización involucra una respuesta sistémica a un alérgeno parenteral, en contra de los pólenes, que inducen respuestas de la mucosa a dosis bajas de alérgenos situados localmente. Además, los protocolos de inmunoterapia en ambos casos son diferentes.

IL-10 es una citocina reguladora que a nivel serológico, en este estudio no muestra ningún patrón diferencial en suero. En muchos trabajos, la tolerancia es independiente de IL-10 (Wiedermann, U. y cols., 1999, Unger, W.W. y cols., 2003, Tsitoura, D.C. y cols., 2000, Alvarez, D. y cols., 2006), aunque para otros, es un elemento importante (Akbari, O. y cols., 2001, Wang, Y. y cols., 2006, Hall, G. y cols., 2003, Stampfli, M.R. y cols., 1999). Esta disparidad puede reflejar un papel diferencial de las células Treg naturales frente a las inducibles. De hecho, el papel de la IL-10 secretada por las Treg naturales es un campo aún controvertido (Shevach, E.M., 2002). Parece que la IL-10 está más asociada a las células reguladoras inducidas, que suelen localizarse en la mucosa.

También puede pensarse que el efecto de la IL-10 se produce en una determinada fase de la reacción alérgica, y no siempre podría ser detectada (Kabbur, P.M. y cols., 2006, Zuany-Amorim, C. y cols., 1995). Probablemente la IL-10 sea más crítica en los primeros estadios de la respuesta inmunitaria, como la presentación antigénica y la interacción de células T, que en las fases posteriores (Akbari, O. y cols., 2001). Además, la tolerancia respiratoria de las primeras fases se produce en los nódulos linfáticos torácicos, donde queda inicialmente confinada (Alvarez, D. y cols., 2006.), y quizá esto haga difícil la detección de cambios en IL-10 de forma sistémica.

Una posible explicación a los resultados es que las respuestas periféricas ocurran de manera independiente o secundaria a los eventos inmunológicos de la mucosa. Se ha demostrado que los anticuerpos IgG específicos inducidos con la inmunoterapia pueden inhibir la presentación de las células presentadoras (APC) a las células T, mediada por IgE (Van Neerven, R.J. y cols., 1999). Así, si el efecto primario de la inmunoterapia fuera inducir anticuerpos IgG, éstos podrían modular la respuesta celular para siguientes exposiciones al antígeno (post-inmunoterapia), modulando la activación de las células T o desviando la respuesta de Th₂ a Th₁. Este proceso, dependiente del alérgeno, será más pronunciado donde haya mayor concentración de alérgeno (en la mucosa), por tanto, los cambios en las respuestas periféricas reflejarían la dispersión de este efecto desde la mucosa, pudiendo ser o no detectable. Por tanto, las PBMCs pueden dar una visión “refleja” de interacciones que están ocurriendo en las mucosas o los órganos linfoides (o ambos). Las respuestas de las PBMCs tras la inmunoterapia son variables y la inducción de la desviación Th₂/Th₁ y la hiporrespuesta no es una característica necesaria para una inmunoterapia exitosa.

Sin embargo, los resultados más relevantes en este estudio fueron observados en los niveles de TGF- β , otra citocina con propiedades reguladoras. Los pacientes alérgicos al polen de olivo, durante la polinización, mostraron los niveles más bajos y los más altos, fuera de ella (Figura 15, página 80). Comparando estos resultados con los obtenidos en controles no alérgicos y en los pacientes alérgicos al polen de olivo tratados, las diferencias fueron significativas. Este dato concuerda con la descripción de TGF- β como mediador necesario para la función supresora de las células reguladoras, apuntando al hecho de que los pacientes alérgicos al polen de olivo, durante la exposición al mismo, tengan un mecanismo regulador inhibido mediado por TGF- β .

TGF- β es una potente citocina (Sharon, M. W., Wanjun, C., 2005). Además de su función supresora cuando está anclado a la membrana, el TGF- β soluble inhibe la proliferación de células T, la activación de macrófagos y modula la actividad de las

células dendríticas. La supresión de esta citocina se asocia a desregulaciones letales del sistema inmune e inflamación multiorgánica. (Kulkarni, A.B., y cols., 1993, Christ, M. y cols., 1994). Además, es crítica para el desarrollo y diferenciación de las células reguladoras FOXP3⁺ (Dardalhon, V. y cols., 2008). Muchas publicaciones (Duarte, J. H. y cols., 2009, Tsuji, M. y cols., 2009, Zhou, X. y cols., 2009, Williams, L. M., Rudensky, A. Y. 2007) y modelos indican que las células reguladoras que pierden FOXP3 se convierten en células Th proinflamatorias, y aunque algunas Treg puedan perder este marcador y seguir con su función, la mayoría mantienen su expresión bajo múltiples condiciones (Rubtsov, Y. P. y cols., 2010). Estos antecedentes, junto al descenso constatado de TGF- β nos llevaron a estudiar los niveles de expresión génica de FOXP3.

Los resultados de expresión de FOXP3 (Figura 17, página 82) muestran cómo está notablemente disminuido en los pacientes alérgicos al polen de olivo en la polinización, mientras que en los sujetos alérgicos tratados con inmunoterapia, los niveles de expresión son semejantes a los controles. Para reafirmar estas observaciones, este resultado se contrastó con otra técnica, la microscopía confocal, utilizando PBMCs sin fijar (*in vivo*), para analizar de forma simultánea la expresión de los marcadores de superficie CD4 y CD25, y el marcador de regulación intracelular FOXP3. La citometría de flujo era otra posibilidad, pero se optó por la microscopía confocal, por disponer de poca muestra, acentuado por el hecho de que las células reguladoras son un mínimo porcentaje del total de PBMCs (5-10% del total de células CD4⁺, Sakaguchi, S. y cols., 1995) y por recuperar las células tras su caracterización, para obtener su material genético.

Mediante el análisis de las PBMCs marcadas con CD4, CD25 y FOXP3, se pudo observar un claro descenso en el número de células reguladoras de los pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento, comparado con los controles no alérgicos y con los pacientes al polen de olivo tratados, ambos con una presencia semejante de células reguladoras y (Figura 18, página 83). Además, y pese al pequeño número de muestras analizadas, la expresión de FOXP3 determinada por qRT-PCR en el RNA extraído de estas células reveló datos acordes a los obtenidos por confocal y a los resultados previos de expresión génica (Figura 17, página 82). Este es, hasta la fecha, uno de los primeros trabajos que demuestran un descenso en la presencia de reguladoras en muestras *in vivo* (sin proceso de fijación) mediante microscopía confocal.

Aunque los datos obtenidos son importantes, este estudio tiene algunas limitaciones. En primer lugar, se analizó la expresión de FOXP3 en PBMCs, es decir, en una mezcla celular. Sería interesante evaluar la expresión en una población celular purificada CD4⁺CD25⁺, ya que FOXP3 no se expresa únicamente en células reguladoras. Además, como ya se ha mencionado, las células de sangre periférica pueden diferir de las células que se encuentran en los sitios de inflamación.

A pesar de las limitaciones, los resultados de FOXP3 son acordes a los resultados obtenidos para la citocina TGF- β . Ambos están disminuidos en los pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento durante la mayor exposición polínica, mientras que los niveles de los pacientes tratados con inmunoterapia son semejantes a los de los controles no alérgicos. Estos datos, junto a los obtenidos en la respuesta humoral, sugieren un descenso de los mecanismos reguladores en los pacientes alérgicos, así como, una recuperación de éstos mediante la inmunoterapia específica (Aguerri, M. y cols., 2012), aunque esta última afirmación tendría que ser confirmada con un estudio longitudinal.

Análisis de expresión génica masiva por microarrays

La predisposición genética, así como el carácter poligénico multifactorial, en el desarrollo de enfermedades alérgicas es un hecho aceptado desde hace muchos años (Sibbald, B. y cols., 1980, Hopp, R.J. y cols., 1984).

La llegada de nuevas herramientas como los microarrays, ha supuesto una revolución para el estudio de enfermedades complejas poligénicas, por la posibilidad de analizar de forma simultánea un elevado número de genes y permitir obtener información a múltiples niveles de complejidad: del más bajo, en el que la expresión de un gen se asocia a un fenotipo particular, al más alto, que permite examinar el transcriptoma completo (genes que se expresan de forma asociada) frente al fenotipo.

El presente trabajo es un ejemplo de cómo el análisis de expresión génica masiva permite definir perfiles capaces de discriminar diferentes situaciones clínicas y describir nuevos elementos implicados en desórdenes complejos como las enfermedades alérgicas.

Los análisis preliminares, tanto el de las fuentes de variabilidad del sistema como el análisis de PCA (Figuras 21 y 22, páginas 88 y 89) ya indicaban la buena separación de los grupos experimentales en función de la expresión génica. Estos resultados auguraban la posibilidad de encontrar genes/rutas diferenciales entre los 5 grupos clínicos estudiados. Aunque PCA es uno de los primeros pasos en los análisis de microarrays (Coulter, E.M. y cols., 2010, Risbano, M.G., y cols., 2010), no es común encontrarse con un resultado tan contundente en la separación de 5 condiciones clínicas, ilustrando cómo una buena clasificación clínica puede ser validada por un *clustering* de expresión génica. Además, este punto acentúa la buena clasificación clínica de los sujetos analizados e incrementa la posibilidad de encontrar diferencias relevantes entre los grupos.

Sin embargo, realizar un ensayo de microarrays no tiene mucho sentido para estudiar unos pocos genes, ya que hay tecnologías más sencillas y precisas para ello. Centrarse únicamente en los genes con las mayores diferencias de expresión tiene una serie de desventajas: tras los múltiples test estadísticos puede que ningún gen tenga la suficiente potencia como para ser significativo, ya que las diferencias de los genes son “modestas” en relación al ruido inherente a la tecnología de microarrays. Y aunque obtuviésemos una lista, quizá los genes obtenidos no tengan un sentido biológico en sí mismo. Además, el análisis exclusivo de genes individuales tiene la desventaja de que los procesos celulares suelen afectar a varios genes de forma concertada, por ejemplo, si una ruta tiene un 20% de los genes afectados el flujo metabólico puede verse dramáticamente alterado, mucho más que si un solo gen de esa ruta presenta un incremento de 20 veces su expresión (Subramaniana, A. y cols., 2005). Por estas razones y con el fin de racionalizar y conectar la gran cantidad de datos que se obtienen en estos ensayos con los ya conocidos, se utilizan bases que agrupan los genes en rutas o vías funcionales.

Siguiendo ese esquema, los datos generados en este trabajo fueron analizados funcionalmente, utilizando dos de las bases más habituales: KEGG y GO (Tabla 16 y 17, páginas 93 y 95).

Los resultados, de forma global, indican que las mayores diferencias de expresión se encuentran entre los pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y los controles no alérgicos (así como con los sujetos asintomáticos). Las vías funcionales están mayoritariamente sobre-expresadas en los pacientes alérgicos, lo que puede indicar un estado general de mayor actividad en estos sujetos. Específicamente, el mayor número de rutas diferenciales se encontró entre el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo y los controles, con 24 y 31 vías significativamente incrementadas durante y fuera del periodo de polinización, respectivamente (Tabla 16, página 93). Estas diferencias tan destacables tienen un sentido biológico, ya que ambos grupos podrían definirse como los

clínicamente más diferentes y por tanto era de esperar que mostraran las mayores diferencias de expresión génica. Así mismo, el grupo de pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento presentó destacables diferencias con el resto de grupos clínicos (Tabla 16, página 93).

La hipótesis de que los pacientes tratados con inmunoterapia específica recuperan, aunque sea parcialmente, las características de un sujeto sano se confirma también en los niveles de expresión génica, ya que ambos grupos son los que globalmente presentan menos vías diferenciales (Tabla 16). También el grupo de sujetos asintomáticos muestra mayor similitud con los sujetos sanos que con los alérgicos. Este grupo resulta especialmente interesante, ya que presenta muchas diferencias con los pacientes alérgicos al polen de olivo, pese a mostrar niveles detectables de anticuerpos específicos (que indican una sensibilización) y estar considerado como grupo de riesgo para el desarrollo de futuras alergias (Settipane RJ, y cols., 1994, Chambers, V.V., Glaser, J., 1958, Horak F., 1985, Plaschke, P.P., 2000, Hagy, G.W., Settipane, G.A., 1971).

De forma predecible, muchas de las rutas diferenciales encontradas en este estudio están directamente relacionadas con la respuesta inmune, tanto de la inmunidad innata como de la específica. Las rutas más diferenciales entre todas las comparaciones de este trabajo se comentan a continuación, destacando genes interesantes bien por su implicación conocida en las enfermedades alérgicas y/o por ser significativos en alguna comparación señalada. El total de las vías KEGG puede consultarse en el Anexo I.

En la respuesta inmune, existen rutas y genes relacionados con la modulación de los riesgos ambientales, como la “Ruta de señalización de los receptores *Toll-like*” que incluye genes de componentes de la respuesta innata (como TOLLIP o TLR4) que interaccionan con el exterior modulando la respuesta. Esta es una de las rutas diferenciales más recurrentes del estudio, generalmente sobre-expresada en las comparaciones de los pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y reprimida en las de los pacientes tratados, sujetos sanos y los sujetos asintomáticos. En la polinización, los sujetos asintomáticos tienen esta vía incluso más disminuida que los sujetos sanos.

Las rutas que afectan a la inflamación forman un grupo muy importante. Este grupo incluye vías reguladoras de la diferenciación Th₁/Th₂ y la función efectora (“Interacción receptores citocina-citocina”, “Procesamiento antigénico y presentación”, “Citotoxicidad mediada por células Natural Killer”). También, la vía denominada “Asma” que contiene múltiples genes relacionados con la desviación inmune hacia Th₂ y aparece incrementada, fuera de la polinización, en los grupos de sujetos alérgicos al polen de olivo frente a asintomáticos o alérgicos no relacionados. Además, la ruta de “Señalización de Fc epsilon RI”, que incluye genes de los más conocidos para el riesgo atópico, como IL-13 y la cadena β del receptor de IgE (Li, X. y cols., 2010, Vladich, F.D. y cols., 2005, Weidinger, S. y cols., 2008), ambos esenciales en la respuesta Th₂ y la inflamación.

Las vías de señalización y los receptores intracelulares o extracelulares relacionados con la inmunidad (especialmente la “Ruta de señalización del receptor de células B”, pero también la equivalente para “células T”), están generalmente incrementadas en los grupos de sujetos alérgicos en ambos periodos de exposición. También son remarcables vías relacionadas con la presentación antigénica (destacando la vía “Procesamiento antigénico y presentación”, y las de “Rechazo de aloinjerto”, “Enfermedad injerto frente a huésped” y “Enfermedad tiroidea autoinmune”) que contienen muchos receptores inmunes, como los del complejo mayor de histocompatibilidad HLA de clase II o la molécula CD8 de las células T citotóxicas.

Otras dos interesantes rutas sobre-expresadas fuera del periodo de polinización en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo frente al control son la de “Migración de leucocitos transendotelial” y la de “Moléculas de adhesión celular (CAMs)”. Contienen

genes que codifican por proteínas encargadas del reclutamiento celular en zonas locales, como las quimiocinas y las moléculas de adhesión celular (CAMs), como las integrinas, que regulan la migración de los leucocitos, su activación y supervivencia, además de participar en la reorganización patológica de los tejidos (remodelado tisular, fibrosis).

Dos rutas KEGG muy reiteradas en las comparaciones durante la polinización “Infección por *E. coli* patogénica” y “EPEC”, contienen genes relacionados con la adhesión celular, receptores Toll y reorganización del citoesqueleto celular. Los grupos control y asintomáticos tienen estas vías muy reprimidas, seguido del grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo con tratamiento.

Apoptosis y ubiquitinación son vías muy diferenciales en este estudio. La apoptosis ha sido muy relacionada con los mecanismos de respuesta que ocurren en los sitios de inflamación alérgica y el remodelado tisular. La ubiquitinación en alergia podría estar involucrada en la regulación de las células T, mediando la supresión de las respuestas Th₂, e incluso algunos de los genes que incluye, como Itch, están implicados en la regulación de la señalización de TGF- β vía SMAD2, afectando al desarrollo de las Treg (Liu, Y.C., 2007). De modo general, los pacientes alérgicos al polen de olivo con tratamiento tienen ambas vías reprimidas, comparado con los pacientes no tratados. El grupo control y los sujetos asintomáticos tienen estas vías aún más reprimidas. Acorde a estos datos, se ha descrito una disminución de rutas relacionadas con apoptosis en pacientes con inmunoterapia para alérgenos de cacahuete (Jones, S.M. y cols., 2009).

Otras vías diferenciales en el estudio no aparentan tener una relación directa con el sistema inmune. Sin embargo, como los genes pueden estar involucrados en múltiples funciones, aparecen clasificados en diversas rutas. Por esta razón, vías con nombres que no sugieren rutas inmunológicas (p.ej. “Enfermedad de Parkinson”), pueden contener genes involucrados en la respuesta inmune. Las rutas KEGG “Enfermedad de Parkinson” y “Enfermedad de Huntington” incluyen genes relacionados con el estrés oxidativo, que influyen en enfermedades crónicas como el asma. La vía “Enfermedad de Parkinson” está significativamente aumentada en los pacientes alérgicos (al polen de olivo sin tratamiento y no relacionados) frente al grupo asintomático y control, en ambos periodos polínicos. Durante la polinización, los pacientes alérgicos tratados tienen esta vía reprimida con respecto al resto de grupos de sujetos alérgicos, mientras que el grupo asintomático tiene esta vía incrementada frente al control. El estrés oxidativo ocurre por acumulación de especies reactivas de oxígeno o por disminución de antioxidantes, pudiendo provocar cambios en el estado de metilación del DNA e incluso daños en la estructura (Birben, E. y cols., 2012). Quizá por ello, en un intento de reparar estos daños, aparezcan vías como “Reparación de bases o de nucleótidos por excisión” sobre-expresadas en los grupos de pacientes alérgicos, comparado con los sujetos sanos o asintomáticos.

Tampoco están aparentemente relacionadas con la respuesta inmunitaria, pero con frecuencia, en este estudio se encuentran diferencialmente expresadas, una serie de vías del metabolismo energético de la célula, como “Fosforilación oxidativa”, “Glucólisis/gluconeogénesis” o “Ciclo del citrato”. Varios trabajos constatan la importancia de estas rutas en las contracciones del músculo liso y la hipoxia provocada en desórdenes asmáticos (Xu, Y.D. y cols., 2010, Kroeger, E. y cols., 1971, Zhao, W., Guenard, H., 1994). En este estudio no se han utilizado células de pulmón o mucosa, sino PBMCs, pero las enzimas de la glucólisis también poseen funciones no relacionadas con el metabolismo energético, como regulación transcripcional, estimulación de la motilidad celular y regulación de la apoptosis (Kim, J.W., Dang, C.V., 2005). En general, estas rutas están incrementadas en los pacientes alérgicos (relacionados o no con el olivo) respecto a los grupos control y asintomático. Los pacientes tratados tienen menor sobre-expresión que los sujetos alérgicos sin tratamiento (relacionados o no con el polen de

olivo). Esto podría reflejar un mayor estado de activación de las células de los individuos con sintomatología alérgica, que haría necesario un mayor nivel de energía, o como ya se ha comentado, alguna función transcripcional desconocida.

En ambos periodos de exposición aparece frecuentemente la vía del “Ciclo celular”, relacionada con la vía de señalización MAPK, la apoptosis, ubiquitinación... así como con la reparación del daño en el DNA y control del crecimiento celular. Destacar dentro de esta vía el gen SCF, especialmente interesante por su papel en los mastocitos, las únicas células ya diferenciadas que expresan este factor. Señalar que este gen, fuera del periodo de polinización, está muy reprimido en los sujetos asintomáticos, más incluso que en los sujetos control. El resto de grupos de pacientes alérgicos tienen niveles significativamente mayores de este gen que el grupo asintomático.

También se encontraron frecuentemente vías que hacen referencia a enfermedades oncológicas como “Cáncer colorectal”, “Cáncer de próstata” y especialmente durante la polinización, la vía de “Leucemia mieloide crónica”. Si se analizan los genes que incluyen, se observa una mezcla de genes apoptóticos, de señalización (sobre todo JAK/STAT, MAPK y TGF- β), ubiquitinación y ciclo celular.

La vía de señalización por MAPK es una de las rutas involucrada en la respuesta inmune más importante (Suzuki, Y. y cols., 2003) y diana de tratamientos farmacológicos en desórdenes inflamatorios (Lewis, T.S. y cols., 1998). Existen otras rutas de señalización intracelular que aparecen como diferenciales en nuestros resultados (Notch, mTOR, Wnt, calcio...). Una de las mejor caracterizadas que promueve el fenotipo Th₂ es la vía JAK-STAT. Los factores de transcripción STAT mantienen el fenotipo Th₂ induciendo la expresión de citocinas y otros genes relevantes. El papel de esta vía en la inflamación alérgica Th₂ es muy conocido (Kuperman, D. A., Schleimer, R. P., 2008), aunque en el presente estudio solamente aparece sobre-expresada en los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento comparado con los sujetos alérgicos no relacionados, fuera del periodo de polinización. En concreto, STAT1 pertenece también a la “Ruta de señalización de los receptores Toll-like”, y es un gen relevante en este estudio. La activación de este gen ha sido implicada en la patogénesis de modelos de enfermedades alérgicas (Chiba, Y. y cols., 2010, Quarcoo, D. y cols., 2004).

La “Ruta de señalización Wnt” también es una vía significativa, sobre todo dentro del periodo de polinización. Los pacientes alérgicos (al olivo o no relacionados) tienen esta vía incrementada frente al grupo control, el grupo de asintomáticos y el grupo de pacientes alérgicos con inmunoterapia. Esta ruta de señalización tiene un papel importante en la polarización Th₂ (Hebenstreit, D. y cols., 2008, Yu, Q. y cols., 2009).

Una de las vías de transducción de la señal más importantes, especialmente durante la estación de polinización, y de las pocas que aparecen reprimidas en este estudio, es la “Rutas de señalización por calcio”. Hay dos rutas básicas de señalización, la del AMPc y la del fosfatidil inositol (Barrett, K.E. y cols., 2010). Cuando los anticuerpos IgE específicos de alérgeno se unen a los Fc ϵ RI de mastocitos y basófilos, estos se entrecruzan y generan una señal intracelular que, en parte, se debe a un incremento en los niveles de calcio. Esta ruta activa la señalización por MAPK y a proteínas NFAT, como NFATC1, cuyo gen es significativo en este estudio y será comentado más adelante.

En esta vía hay que destacar el gen del receptor GPCR, significativamente disminuido en los sujetos alérgicos no relacionados comparado con los asintomáticos fuera de la polinización. GPCR actúa como un sensor clave del exterior celular que activa diversas vías de transducción. Es interesante señalar que algunos de sus ligandos son hormonas y neurotransmisores, uniendo la vía de señalización por calcio con la de los ligandos neuroactivos. Frecuentemente, hemos encontrado estas dos vías juntas en las comparaciones. Sus roles fisiológicos incluyen la regulación del sistema inmune e

inflamación, transmisión de señales simpáticas o parasimpáticas del sistema nervioso autónomo, modulación de la homeostasis, regulador del crecimiento celular...etc.

Los linfocitos poseen canales de voltaje por calcio, denominados CaV, con función controvertida (Kotturi, M.F. y cols., 2006, Badou A. y cols., 2006). El gen que codifica por CaV1, está significativamente sobreexpresado en la misma comparación descrita para GPCR. Parece que defectos en CaV afectan a la vía de NFATC1, provocando una menor secreción de citocinas, sin afectar a la capacidad proliferativa.

Finalmente, el ejemplo más significativo de vías no aparentemente asociadas al sistema inmune es la vía de la “Interacción de los ligandos y receptores neuronales”, la ruta diferencial más reprimida en los pacientes alérgicos de este estudio (Figura 25, página 100). El sistema nervioso y el sistema inmune son dos sistemas con interacciones bidireccionales, y aunque la contribución del sistema nervioso ha sido subestimada o ignorada durante mucho tiempo, cada vez hay más evidencias de la estrecha relación entre ambos. De hecho, dentro de esta ruta se encuentran genes muy conocidos por su acción en la inmunidad y en concreto, en enfermedades alérgicas. Los receptores acoplados a proteínas G (*G protein-coupled-receptors* o GPCRs) son la mayor familia de receptores celulares de superficie, representando más del 1% de los genes humanos (Walker, J.K.L. y cols., 2011). Estos receptores transducen una gran variedad de señales que permite a la célula establecer comunicaciones inter- e intra- celulares y son muy importantes en el desarrollo de medicamentos, ya que, entre la mitad y las tres cuartas partes de los fármacos producen su efecto a través de ellos. En el sistema inmune, los GPCRs influyen en la inmunidad innata y adaptativa, por ejemplo, los receptores de quimiocinas y neurotransmisores como la norepinefrina (NE), estimulan los receptores β -adrenérgicos de las células B para activar la vía del AMPc/PKA, que finalmente activa la transcripción de genes involucrados en secreción, proliferación, producción de inmunoglobulinas...etc (Mayr, B. y cols., 2001). Algunos neurotransmisores que aparecen en este estudio, y que ejercen su función a través de GPCRs, son tan conocidos como la histamina, producida por basófilos y mastocitos, que incrementa la permeabilidad de los capilares permitiendo la entrada a los tejidos y provocando los síntomas alérgicos clásicos, o la acetilcolina, necesaria para la contracción de la vía aérea que sucede en los sujetos asmáticos.

Existen en esta vía algunos genes interesantes a destacar por ser diferenciales en alguna comparación (especialmente la de pacientes alérgicos al polen de olivo frente a sujetos asintomáticos) o por su función en la regulación inmune.

Un neurotransmisor significativo con receptores GPCRs es la serotonina (5-HT). Tras un daño o la liberación de sustancias inflamatorias (como C3a, C5a, complejos IgE), se libera rápidamente (Pfeiffer, J. R., y cols., 1985, König, B. y cols., 1992) atrayendo a eosinófilos, células dendríticas y mastocitos (Boehme, S. A., y cols., 2004, Müller, T. y cols., 2009), estimulando la fagocitosis de los macrófagos y aumentando la citotoxicidad de las células NK (Freire-Garabal, M. y cols., 2003). En general, 5-HT promueve citocinas pro-inflamatorias y ayuda a la comunicación entre la inmunidad innata y la adaptativa (Mössner, R., Lesch, K. P., 1998), promoviendo la estimulación de las células T a través de macrófagos, interacciones entre monocitos y células NK.

Durante la inflamación alérgica, varios estudios han mostrado que la producción local de neurotrofinas (proteínas que favorecen la supervivencia de neuronas) incrementa la síntesis de neuropéptidos, lo que aumenta la hiperreactividad frente a los estímulos (Nockher, W.A., Renz, H., 2006).

Otros péptidos cuyos genes aparecen en esta vía y actúan a través de GPRCs tienen roles muy importantes en la respuesta alérgica. Es el caso de las anafilotoxinas C3a y C5a, y de sus receptores, que forman parte del sistema de complemento, un conservado

sistema de detección de señales de peligro. Las anafilotoxinas son potentes mediadores inflamatorios que regulan la vasodilatación, contracción del músculo liso, producción de histamina, migración de células inmunes, etc. Una producción alterada de C3a se asocia a asma y se han identificado polimorfismos en C3/C3aR (Hasegawa, K., y cols., 2004).

El neuropéptido Y (NPY), que actúa a través de receptores GPRC, tiene un papel regulador en eventos relacionados con el sistema nervioso y el sistema inmune (Bedoui, S. y cols., 2003), con un rol destacable en enfermedades de las vías respiratorias (Groneberg, D. A. y cols., 2004). Según modelos murinos (Kawamura N, 1998) induce la producción de IL-4 y disminuye la de IFN- γ y estudios *in vitro* confirman que estimula el fenotipo Th₂ (Bedoui, S. y cols., 2003).

PACAP es un neuropéptido que se une a tres receptores acoplados a proteínas G (PACAPR). Está ampliamente distribuido en el tracto respiratorio y tiene efecto broncodilatador en el músculo liso. Se ha postulado como una futura diana terapéutica para el tratamiento del asma (Groneberg DA y cols., 2006). Su efecto anti-inflamatorio se debe a su capacidad de inhibir citocinas pro-inflamatorias así como, proteínas co-estimuladoras de superficie en células T (Pozo D, y cols., 2009), macrófagos (Delgado, M., Ganea, D., 2001), monocitos (Delgado. M, Ganea. D., 2003) y células dendríticas (Delgado M, y cols., 2004). Deficiencias en algunos de sus receptores, provocan un aumento significativo de la inflamación pulmonar en un modelo alérgico murino (Lauenstein, D. y cols., 2011). Este neuropéptido, en general, está disminuido en los pacientes alérgicos al polen de olivo.

El grupo formado por los prostanoideos incluye moléculas muy conocidas en los desórdenes alérgicos: las prostaglandinas (PG) y los tromboxanos (TBX). Ambas son sintetizadas en la vía de la ciclooxigenasa (COX) a partir del ácido araquidónico. Las prostaglandinas son broncoconstrictoras y vasodilatadoras, además de atraer leucocitos a la zona de inflamación (Boyce, J.A. y cols., 2008). También son potentes agentes de los nervios sensoriales. Tienen sus receptores G específicos en las neuronas sensoriales, que activan vías de señalización, aumentando la hipersensibilidad, ya que a su vez activan otras vías de sinapsis (Richardson, J. y cols., 2002). El miembro más importante de los tromboxanos (TXA₂) actúa en la contracción del músculo liso y activación de respuestas inflamatorias endoteliales y agregación plaquetaria (Ricciotti, E. y cols., 2011).

La vía de “Interacción de ligandos y receptores neuractivos” incluye además hormonas que actúan a través de GPRCs. La melatonina (MEL) es una hormona producida por la glándula pineal, con un importante papel en la eliminación de los radicales libres tóxicos, siendo el antioxidante lipofílico más efectivo (Gumral, N. y cols., 2009). Esta hormona está significativamente disminuida en los sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento frente a los asintomáticos. Por otro lado, la relaxina (RLX), hormona relacionada con el embarazo, de la que se han identificado dos receptores de alta afinidad, LGR7 y LGR8 (Luna, J.J. Y cols., 2004), se ha relacionado con efectos protectores de la reacción alérgica. En un modelo animal de asma alérgica (Bani, D. y cols., 1997) la relaxina previene la degranulación de mastocitos y reduce el número de neutrófilos. En este estudio, sus receptores están disminuidos en los sujetos alérgicos.

Las moléculas anteriormente descritas actúan a través de receptores acoplados a proteínas G, pero en esta vía neuractiva también hay genes de otros tipos de receptores, como los canales iónicos. Los de glutamato y otros aminoácidos como el L-Aspartato o el ácido L-cisteico tienen una expresión disminuida en los pacientes alérgicos al polen de olivo sin tratamiento frente al grupo asintomático. Es destacable que el glutamato tiene un papel mediador de la respuesta inmune (Fallarino, F. y cols., 2010, Xue, H., Field, C.J., 2011). Otro gen, el del receptor de la leptina, también es interesante por su posible implicación en la inflamación alérgica (Goldberg, A. C. y cols., 2009).

A pesar de la gran información que aporta, la agrupación funcional (KEGG) tiene ciertas limitaciones, como la posibilidad de sobre-representar ciertas rutas, por varios motivos: ser rutas que involucren muchos genes o genes muy grandes o con muchas variantes detectadas y por tanto, con más posibilidades de ser incluidos. También pueden priorizarse rutas con genes que ocupan las regiones mejor cubiertas por el microarray. Además, existe un sesgo intrínseco al método de clasificación, que es no considerar genes (que aparecen en el microarray) cuya función se desconoce (Elbers, C.C. y cols., 2009).

En este estudio, los términos GO también se han utilizado como herramienta de clasificación, aunque su discusión es más compleja que los datos de KEGG, por su visión más general. Es difícil comparar resultados entre ambas bases de datos, ya que, como GO clasifica según procesos biológicos, normalmente éstos involucran varias rutas funcionales que suelen interactuar.

La anotación biológica tiene como ventaja dotar a los resultados de un valor biológico añadido, pero si se usa para guiar el análisis puede desviar los resultados hacia el conocimiento biológico ya conocido. Por ello, el concepto de clasificación funcional es muy útil pero debe hacerse con precaución para no sesgar los resultados.

Aunque la tecnología de microarrays puede generar avances científicos significativos, todavía cuenta con algunos problemas. No hay criterios estándares entre los sistemas de microarrays respecto a toma de muestras, análisis, validación y recolección de datos. Además, el alto coste de los chips suele implicar que el número de réplicas o muestras analizadas sea normalmente bajo, lo que conlleva el riesgo de obtener resultados incorrectos. El bajo tamaño muestral y la complejidad del análisis pueden implicar riesgos de sobre-interpretación de los resultados, existiendo la posibilidad de que los datos obtenidos sean válidos y útiles sólo para un pequeño set de pacientes o sujetos, pero no puedan ser generalizados. Además, si la muestra es una mezcla celular (p.ej. un tejido o PBMCs) los datos reflejan una mezcla de la expresión de todas las células, pudiendo ser que tan sólo una parte reflejen información relevante sobre la enfermedad o bien esté enmascarada. Por el contrario, también puede ocurrir que un estudio de un sólo tipo celular no sea representativo de una enfermedad en el que se involucran muchos sistemas (Benson, M. y cols., 2004). La estrategia de *pooling* se utiliza en este tipo de tecnologías con objeto de minimizar los costes, además de que en algunas ocasiones se dispone de muy poca muestra. Esta estrategia podría provocar pérdida de información, sin embargo, existen investigaciones que demuestran que esta pérdida no tiene consecuencias prácticas (Faraggi, D. y cols., 2003) y de hecho, el análisis de validación posterior debe realizarse con muestras individuales y frecuentemente en una población diferente, creándose así una relación independiente entre ambos perfiles.

Para evitar establecer asociaciones al azar es por tanto necesario validar y posteriormente contrastar. La validación es una etapa indispensable y suele realizarse a través de otra técnica, normalmente qRT-PCR, en una población más grande e independiente. En este trabajo, los análisis diferenciales por microarrays han generado un gran volumen de datos muy interesantes, sobre cuyo análisis se deben fundamentar estudios que validen posibles genes y rutas diferenciales entre sensibilización y tolerancia. Por ello, como punto de partida, se seleccionaron 93 genes relevantes (Tabla 22, página 105) de entre todas las comparaciones, intentando que representaran el mayor número posible de vías funcionales diferenciales. Además, los genes debían de tener un *fold change* >2 o <-2 y un valor de *p* significativo, como criterios estadísticos. Estos genes fueron analizados en una población mayor mediante qRT-PCR con el fin de validar su importancia. Los resultados demostraron que 35 genes permitían de forma significativa, definir un patrón molecular capaz de distinguir, desde el punto de vista genómico, los cuatro grupos clínicos respecto de la población control, con una

especificidad del 87,5% y una sensibilidad máxima del 90% (Aguerri, M. y cols., 2013). Hasta el momento, este es el primer artículo que describe un perfil molecular que discrimine cuatro situaciones clínicas. Estos datos abren la posibilidad de encontrar nuevos biomarcadores que ayuden en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Los 35 genes se reanalizaron funcionalmente con la base bioinformática DAVID y la base de interacciones proteicas STRING, para conocer su función e interrelación, así como su posible papel en la enfermedad. La Tabla 23 (página 113) y la Figura 28 (página 114) resumen los resultados de estos análisis. Los agrupamientos principales, “Activación celular” y “Moléculas de adhesión celular”, incluyen 13 y 9 genes, respectivamente (Tabla 23, página 113). En la Figura 28, proporcionada por STRING, conforman principalmente la zona central (activación celular) y la zona inferior (moléculas de adhesión), estando ambas vías relacionadas a través de los genes CD86, CD40 y CD48. Todos estos genes ya han sido relacionados con las respuestas inmuno-alérgicas. CD86 (receptor expresado en células presentadoras de antígeno) y CD40 (miembro de la súper-familia de receptores TNF), están implicados en la respuesta inmune adaptativa, la presentación antigénica, la respuesta inflamatoria y la diferenciación Th₁/Th₂. También aparecen el gen SPN (sialoforina o CD43), que codifica para una proteína que regula la diferenciación Th₂ y la inflamación y el gen de CD48, proteína anclada a glicosil-fosfatidil-inositol, involucrada en el proceso de adhesión, activación y co-estimulación de linfocitos. CD48 ha sido descrito como crítico en la inflamación alérgica eosinofílica del tracto respiratorio y potencial nueva diana terapéutica para la supresión del asma (Munitz, A. y cols., 2007). Otros genes como los de los antígenos HLA de clase II, DQB1 y DRB1, relacionados con la presentación antigénica y activación, son algunos de los más relacionados con las enfermedades alérgicas. IL-10, citocina anti-inflamatoria (cuya expresión proteica fue estudiada en el suero) aparece como gen significativo y se relaciona con la anergia de las células T y la tolerancia del sistema inmune (Jutel, M. y cols., 2003). El gen que codifica por el factor de transcripción NFATC1, ya citado previamente, está relacionado con la inducción de numerosos genes, incluyendo la regulación de las citocinas de las células Th₂ (Sumpter, T.L. y cols., 2008). Estrechamente relacionados están los genes que codifican por LCK (proteína tirosín-quinasa específica de linfocitos), LYN (crítica para la anafilaxia mediada por IgE y activar mastocitos en ratones) (Lee, J.H. y cols., 2011) y ZAP70 (proteína quinasa asociada a la cadena ζ del TCR). Estas tirosín quinasas participan en la primera señal detectable en respuesta a la activación de las células inflamatorias inducida por la unión del antígeno al receptor. La activación induce quimiotaxis de las células inflamatorias.

Las moléculas de adhesión molecular se reafirman como un grupo de genes importante, como SELL (selectina L), que juega un papel en la extravasación de leucocitos y en el remodelado tisular, y VCAN (versican). Las integrinas ITGAL (integrina alfa L), ITGB7 e ITGB8 (integrinas beta 7 y 8) también son significativas en la validación. ITGAL e ITGB8 se han relacionado con la mediación de TGF- β en el control de la proliferación epitelial de las vías respiratorias humanas (Fjellbirkeland, L. y cols., 2003) e ITGB7 tiene un importante papel en la adhesión celular y migración de células B.

Los siguientes agrupamientos por abundancia de genes reúnen genes relacionados con la respuesta inflamatoria (7 genes), apoptosis (7), ruta de señalización MAPK (5) y el agrupamiento de interacción neuractiva ligando-receptor (5).

El primer *clustering* incluye el gen ALOX5 (5-lipoxigenasa), enzima que cataliza la producción de leucotrienos a partir del ácido araquidónico y se ha asociado con asma y enfermedades alérgicas (Duroudier, N.P. y cols., 2009). Otro gen, el de C3AR1, receptor de la proteína C3 del complemento, al que se ha relacionado con la hiperrespuesta de la vía respiratoria (Hasegawa, K. y cols., 2004) y recientemente, descrito como potencial

biomarcador de exposición alérgica aguda respiratoria (Pucheu-Haston, C.M. y cols., 2010). Genes de diversas quinasas, como PRKACA, que se asocia al remodelado tisular y favorece la señalización de la vía de los leucotrienos (Hoshino, M. y cols., 1998), pudiendo contribuir a la patogénesis del asma. Otra quinasa, PRKACB codifica por la subunidad beta catalítica de la proteína quinasa A (PKA), activada por AMPc. Aunque PKA se involucra en muchos procesos celulares, ésta es la primera asociación descrita entre este gen y una enfermedad alérgica.

Otras proteínas quinasas interesantes incluyen AKT1, una serín treonín quinasa involucrada en la vía NF- κ B, con actividad anti-apoptótica y asociada a la ruta de señalización por receptores Toll. También MAPK13, miembro de la familia de las MAP quinasas, interesante por integrar diversas señales y regular varios procesos celulares, como la proliferación, diferenciación, regulación de la transcripción y desarrollo. Puede activarse por citocinas proinflamatorias y estrés celular. Muy relacionada con MAPK encontramos a SOS1. Este gen codifica por *Son of Sevenless 1*, una proteína de unión a nucleótidos para la transducción de señales. Pocos estudios implican a SOS1 con la enfermedad humana, pero recientemente se describió que el gen SOS1 se induce por una toxina medioambiental, la dioxina (Pierre, S. y cols., 2011). Esta observación sugiere que alteraciones en la expresión de SOS1 y, consecuentemente, en su actividad, puedan afectar a las vías de eliminación toxicológicas y conducir a la enfermedad. Es de destacar, que no existe ningún estudio que asocie este gen con las enfermedades alérgicas.

Los genes apoptóticos aparecen en la parte superior del gráfico de STRING (Figura 28). De estos genes, BAX, que pertenece a la familia de Bcl2, se ha implicado en la apoptosis de células del tracto respiratorio de pacientes asmáticos (Abdulmir, A.S. y cols., 2009) y APAF1 (factor 1 activador de peptidasas apoptóticas) se ha relacionado con la patofisiología de las enfermedades del pulmón (Kuwano, K. y cols., 2005).

Otro gen apoptótico es NLRP3 (*NOD-like receptor*), miembro del inflamosoma, relacionado con la respuesta innata y recientemente descrito como factor crítico en el desarrollo de la inflamación del pulmón (Besnard, A.G. y cols., 2011). La vía que involucra a NLRP3/IL1 puede ser una diana terapéutica interesante en alergia. La activación del inflamosoma, que ocurre durante la inflamación del pulmón en el proceso alérgico, contribuye a la función de las células dendríticas y a la inducción de la respuesta Th₂. Por último, en el agrupamiento de apoptosis se encuentra GZMH (granzima H), una serín proteasa expresada en células citotóxicas efectoras. La granzima H se expresa de forma constitutiva en células NK. La alta expresión de este gen en células NK *naïve* parece sugerir que aumente rutas de muerte celular alternativas en la inmunidad innata (Fellows, E. y cols., 2007). Esta es la primera asociación entre alergia y el gen GZMH.

Una de las vías más reprimidas e interesantes que se confirma en la validación, es la vía de la interacción de los ligandos neuroactivos. En la Figura 28, sus genes se distribuyen en 2 agrupaciones en la parte derecha. En una de ellas aparecen juntos 2 genes predecibles, pero importantes, ADRB1 (receptor beta adrenérgico 1) y PTGER2 (receptor 2 E-prostanoide), ambos estudiados para el tratamiento del asma (Waldeck, B., 2002, Sturm, E.M. y cols., 2008). En la otra agrupación tenemos el gen de FPR3, receptor de la inmunidad innata, que podría estar implicado en el remodelado tisular nasal (Prevete, N. y cols., 2011). Unido a FPR3 está el gen de S1PR5, receptor GPRC, que se expresa mayoritariamente en células dendríticas y NK. Reconoce al lípido esfingosina-1-fosfato (S1P) y es requerido por las células NK para ir al sitio de inflamación. En asma alérgico, los niveles de S1P están elevados en el fluido bronquial después de una estimulación alérgica (Idzko, M. y cols., 2006). Mas aún, antagonistas de S1PR eliminan el asma experimental, alterando la función de las células dendríticas (Idzko, M. y cols., 2006) y el desarrollo de conjuntivitis alérgica en ratones (Sumi, T. y cols., 2009).

La vía “Proteólisis mediada por ubiquitinas” incluye SMURF1, que codifica por la ubiquitina ligasa E3, que regula la señalización de la superfamilia de TGF- β . Entre otras funciones, regula el desarrollo del embrión y ésta es la primera asociación conocida con alergia. TRIM37 es un gen que codifica por un miembro de la familia de proteínas con motivos tripartitos (TRIMs), muy relacionados con diversas funciones celulares como el desarrollo de patrones y oncogénesis. TRIM37 se ha descrito muy recientemente como un biomarcador muy útil en asma (Shin, S.W. y cols., 2011).

Finalmente, se han encontrado 2 genes, clasificados como “Misceláneos”, nunca antes relacionados con enfermedades alérgicas: CRTAP (proteína asociada a cartílago) relacionada con el colágeno (Morello, R., Rauch, F., 2010) y TAGAP, cuya proteína incrementa la actividad GTPasa de Rho, expresado en altas dosis en células del sistema inmune, incluyendo células B y T, con función desconocida. Está asociada al riesgo de 3 desórdenes autoinmunes: la enfermedad celíaca (Smyth, D.J. y cols., 2008), diabetes tipo I (Smyth, D.J. y cols., 2008) y recientemente, artritis reumatoide (Chen, R. y cols. 2011).

No todos los genes significativos en el microarray se confirman como diferenciales en la etapa de validación. Experimentos previos (Soref, C.M. y cols., 2001, Gupta, R.A. y cols., 2001, Chaib, H. y cols., 2001) muestran que los resultados de los microarrays (especialmente los de cambio de expresión) son sólo parcialmente consistentes con los obtenidos con qRT-PCR o *Northern blot*. Incluso el mismo tipo celular con el mismo tratamiento produce resultados diferentes con ambas técnicas, por diversas razones, como que la estabilidad del RNAm puede causar diferencias en su detección, sobre todo si hay diferencias de tiempo entre la recolección de la muestra y el ensayo (Johnson, M.A. y cols., 2000, Ohme-Takagi, M. y cols., 1993) Además, los microarrays pueden contener secuencias erróneas, hibridación cruzada, variantes génicas no reconocidas, etc., además de falsos positivos o genes que se expresen al azar, sin relación con el estudio, por el complejo análisis de datos que involucra a cientos de genes, aunque los ajustes estadísticos suelen minimizar este hecho. Por último, los microarrays detectan un rango dinámico de expresión génica muy amplio en un solo ensayo, desde especies de RNAm muy poco abundantes, a genes endógenos (*housekeeping*) como el 18S, lo que puede implicar saturación en algunos casos, cosa que no ocurre en la técnica de qRT-PCR.

En resumen, a pesar de la complejidad de los resultados y la necesidad de profundizar en su relevancia biológica con estudios funcionales, el análisis genético masivo ha demostrado, en primer lugar, cómo una buena clasificación clínica permite el agrupamiento basado en datos de expresión génica. Segundo, se ha definido un perfil de 35 genes capaz de discriminar diferentes condiciones clínicas con una buena especificidad y sensibilidad, que podrían ser útiles para definir biomarcadores de la enfermedad, su pronóstico y dianas terapéuticas. Finalmente y muy importante, además de validar elementos que juegan un papel crucial en la patogénesis alérgica, se han identificado nuevos genes/rutas que podrían ser relevantes en ésta y otras enfermedades alérgicas. Estos genes (además de los ya conocidos) son especialmente interesantes para realizar estudios que ayuden a comprender su significado biológico, como ensayos de silenciamiento génico con siRNA (*small interfering RNA*) en los que se module la expresión del gen para conocer su impacto en el fenotipo. También pueden ser de gran utilidad estudios de epigenética (metilación, histonas y otras proteínas de unión al DNA) que nos permitan entender la regulación de esos genes en el contexto de la enfermedad.

Este es el primer estudio que aplica una aproximación genómica a gran escala en el análisis de patrones diferenciales de expresión génica en la respuesta frente al polen de olivo. Los resultados obtenidos identifican potenciales biomarcadores y/o dianas terapéuticas que podrán ser útiles para la diagnosis y tratamiento de estas enfermedades en el futuro.

CONCLUSIONES

El trabajo de investigación presentado en esta memoria aporta una serie de resultados que han permitido, por un lado, la caracterización humoral y celular de una población de sujetos que responden clínicamente de forma diferente a una elevada carga antigénica ambiental, y por otro lado, la comparación de la expresión génica masiva de estos grupos, ha revelado información acerca de los posibles mecanismos genéticos operativos en la enfermedad.

Las conclusiones derivadas de esta tesis son:

A) Respecto a la caracterización inmunológica

1. Los resultados de la respuesta humoral, junto al descenso de TGF- β en suero y de la expresión génica de FOXP3, en el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo, sugieren un descenso de los mecanismos reguladores en los pacientes alérgicos al polen de olivo en el periodo de mayor exposición alérgica.
2. Los pacientes tratados con inmunoterapia no muestran este descenso de TGF- β y FOXP3, e incrementan sus niveles de anticuerpos IgG4 específicos, indicando que la respuesta reguladora puede ser normalizada mediante la inmunoterapia específica.
3. Los pacientes alérgicos al polen de olivo tratados con inmunoterapia no modifican sus niveles de IgE específica.
4. La respuesta humoral específica en los pacientes alérgicos al polen de olivo (tratados o no), principalmente los niveles de IgE e IgG4, se mantiene alta fuera del periodo de polinización, hecho que podría ser debido a la elevada carga antigénica del modelo de estudio.
5. La respuesta celular periférica no refleja cambios significativos en los niveles medios de citocinas Th₁/Th₂, pero sí indica que hay un aumento de sujetos con niveles detectables de citocinas Th₂ en los grupos alérgicos.

B) Respecto al análisis de expresión génica diferencial

6. Se ha definido un perfil de expresión génica de 35 genes, capaz de discriminar cuatro condiciones clínicas frente a un grupo control. Estos genes, podrían ser útiles como futuras herramientas de mejora para el diagnóstico y el tratamiento de la alergia.
7. Además de validar genes previamente asociados con la enfermedad, se han encontrado genes que nunca antes han sido relacionados con enfermedades alérgicas.
8. Se han encontrado diferencias específicas de cada grupo clínico, reafirmando la buena clasificación clínica, y abriendo la posibilidad de encontrar dianas potencialmente relevantes a nivel funcional.

9. Las mayores diferencias de expresión génica globales se encontraron entre el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y los grupos control (no alérgicos y sujetos asintomáticos).
10. Las menores diferencias de expresión génica globales se encontraron entre el grupo de sujetos alérgicos al polen de olivo con inmunoterapia específica y los controles. Junto a los resultados de la respuesta inmunológica (humoral y celular), este dato refuerza la hipótesis de que la inmunoterapia recupera, al menos parcialmente, las características de un sujeto sano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdulamir, A.S., Kadhim, H.S., Hafidh, R.R., Ali, M.A., Faik, I., Abubakar, F., Abbas, K.A. (2009) Severity of asthma: the role of CD25+, CD30+, NF-kappaB, and apoptotic markers. *Journal of Investigation in Allergy and Clinical Immunology*. 19(3):218-224.
2. Aguerri, M., Calzada, D., Martín, E., F. Florido, J. Quiralte, J. Delgado, A. Miranda, J.M. López-Cacho, S. Gallardo, C. Lahoz, B. Cárdena (2012) FOXP3 and TGF- β : Differential regulatory molecules between sensitization and tolerance to olive pollen. *European Journal of Inflammation*. 10(2): 193-202.
3. Aguerri, M., Calzada, D., Montaner, D., Mata, M., Florido, F., Dopazo, J., Lahoz, C., Cárdena, B. (2013) Differential gene-expression analysis defines a molecular pattern related to olive pollen allergy. *Journal of Biological Regulators Homeostatic Agents*. 27(2):337-350.
4. Ahlbom, A. Backman, J. Bakke, T. Foucard, S. Halken, N.I., Kjellman, M., (1998) NORDPET: pets indoors: a risk factor for or protection against sensitization/allergenicity. *Indoor Air*. 8: 219–235.
5. Akbar, A.N., Taams, L.S., Salmon, M., Vukmanovic-Stejić, M. (2003) The peripheral generation of CD4+ CD25+ regulatory T cells *Immunology*. Jul; 109(3):319-325.
6. Akbari, O., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T. (2001) Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nature Immunology*. Aug; 2(8):725–731.
7. Akdis, C.A., Akdis, M., Blesken, T., Wymann, D., Alkan, S.S., Müller, U., Blasér, K. (1996) Epitope-specific T cell tolerance to phospholipase A2 in bee venom immunotherapy and recovery by IL-2 and IL-15 in vitro. *Journal of Clinical Investigation*. Oct 1; 98(7):1676-1383.
8. Akdis, C.A., Blaser, K. (1999) IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy. *FASEB Journal*. Apr; 13(6):603-609.
9. Akdis, C.A., Blaser, K., Akdis, M. (2004b) Genes of tolerance. *Allergy*. 59(9):897-913
10. Akdis, C.A., Blesken, T., Akdis, M., Wüthrich, B., Blaser, K. (1998) Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *Journal of Clinical Investigation*. Jul 1; 102(1):98-106.
11. Akdis, M., Blaser, K., Akdis, C.A. (2005) T regulatory cells in allergy: novel concepts in the pathogenesis, prevention, and treatment of allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Nov;116(5):961-968
12. Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Cramer, R., Thunberg, S., Deniz, G. (2004a) Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells. *Journal of Experimental Medicine*. 199(11): 1567–1575.
13. Al-Shahrour, F., Díaz-Uriarte, R., Dopazo, J. (2004) FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. *Bioinformatics*. Mar 1; 20(4):578-580.
14. Alvarez, D., Swirski, F.K., Yang, T.C. (2006) Inhalation tolerance is induced selectively in thoracic lymph nodes but executed pervasively at distant mucosal and nonmucosal tissues. *Journal of Immunology*. Feb 15; 176(4):2568–2580.

15. Apelberg, J., Aoki, Y., Jaakkola, J. J. K. (2001) Systematic review: exposure to pets and risk of asthma and asthma-like symptoms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 107(3): 455–460.
16. Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G. (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics*. May; 25(1):25-29.
17. Bach, J.F. (2002) The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England Journal of Medicine*. 34(12):911–920.
18. Badou, A. (2006) Critical role for the β regulatory subunits of Cav channels in T lymphocyte function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 103(42):15529–15534.
19. Baldo, B.A., Panzani, R.C., Bass, D.y Zerboni, R. (1992) Olive (*Olea europaea*) and privet (*Ligustrum vulgare*) pollen allergens. Identification and cross-reactivity with grass pollen proteins. *Molecular Immunology*. 29; 1209.
20. Bani, D., Ballati, L., Masini, E., Bigazzi, M., Bani Sacchi, T. (1997) Relaxin counteracts asthma-like reaction induced by inhaled antigen in sensitized guinea pigs. *Endocrinology*. 138(5):1909–1915.
21. Barranco, D. Rallo, L. (1984) Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. M° de Agricultura-Junta de Andalucía, Madrid. 387 pp.
22. Barrett, K.E., Barman, S.M., Boitano, S., Brooks, H. (2010) Chapter 2. Overview of Cellular Physiology in Medical Physiology. In: K.E. Barrett, S.M. Barman, S. Boitano, H. Brooks (Eds), *Ganong's Review of Medical Physiology*, 23e.
23. Batanero, E., Crespo, J.F., Monsalve, R.I., Martin-Esteban, M., Villalba, M., Rodriguez, R. (1999) IgE-binding and histamine-release capabilities of the main carbohydrate component isolated from the major allergen of olive tree pollen, Ole e 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 103(1 Pt 1):147-153.
24. Bauchau, V., Durham, S.R. (2004) Prevalence and rate of diagnosis of allergic rhinitis in Europe. *European Respiratory Journal*. Nov; 24(5):758-764.
25. Baye, T.M., Martín, L.J., Hershey, G.K.H. (2010) Application of genetic/genomic approaches to allergic disorders. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Sept; 126(3): 425-436.
26. Bedoui, S., Kawamura, N., Straub, R.H., Pabst, R., Yamamura, T., von Horsten, S. (2003) Relevance of neuropeptide Y for the neuroimmune crosstalk. *Journal of Neuroimmunology*. 134(1-2):1–11.
27. Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing". *Journal of the Royal Statistical Society. Series B*; 57(1): 289–300.
28. Benjaponpitak, S., Oro, A., Maguire, P., Marinkovich, V., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T. (1999) The kinetics of change in cytokine production by CD4 T cells during conventional allergen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mar; 103(3 Pt 1):468-475.

29. Bennett, C.L., Ochs, H.D. (2001) IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena. *Current Opinion in Pediatrics*. Dec; 13(6):533-538.
30. Benson, M., Mobini, R., Barrenäs, F., Halldén, C., Naluai, A.T., Säll, T., Cardell, L.O. (2009) A haplotype in the inducible T-cell tyrosine kinase is a risk factor for seasonal allergic rhinitis. *Allergy*. Sep; 64(9):1286-1291.
31. Benson, M., Olsson, M., Rudemo, M., Wennergren, G., Cardell L.O. (2004) Pros and con of microarray technology in allergy research. *Clinical and Experimental Allergy*. 34(7):1001-1006.
32. Besnard, A.G., Guillou, N., Tschopp, J., Erard, F., Couillin, I., Iwakura, Y., Quesniaux, V., Rife, B. (2011) NLRP3 inflammasome is required in murine asthma in the absence of aluminum adjuvant. *Allergy*. 66(8):1047-1057.
33. Birben, E., Murat Sahinler, U., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O. (2012) Oxidative Stress and Antioxidant Defense, *World Allergy Organization Journal*. Jan; 5(1): 9–19.
34. Björkstén, F., Suoniemi, I. (1981) Time and intensity of first pollen contacts and risk of subsequent pollen allergies. *Acta Medica Scandinavica*. 209(4):299-303.
35. Blanca, M., Boulton, P., Brostoff, J., Gonzalez-Reguera, I. (1983) Studies of the allergens of *Olea europea* pollen. *Clinical Allergy*. Sep; 13(5):473-478.
36. Blanco, C., Crespo, J.F., Cabans, R., Vega, A., López, C., Martínez, F. (1992) *Olea europea* pollen allergy. *Allergy*. 47(suppl.):77.
37. Bluestone, J.A., Abbas, A.K. (2003) Natural versus adaptive regulatory T cells. *Natural Reviews Immunology*. Mar; 3(3):253-257.
38. Blumenthal, M.N. (2005) The role of genetics in the development of asthma and atopy. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 5(2):141-145.
39. Boehme, S.A., Lio, F.M., Sikora, L., Pandit, T.S., Lavrador, K., Rao, S. P., and Sriramaraio, P. (2004) Cutting edge: serotonin is a chemotactic factor for eosinophils and functions additively with eotaxin. *Journal of Immunology*. 173(6): 3599–3603.
40. Bolstad, B.M., Irizarry R. A., Astrand, M., Speed, T.P. (2003) A Comparison of Normalization Methods for High Density Oligonucleotide Array Data Based on Bias and Variance. *Bioinformatics*. 19(2):185-193.
41. Bottcher, M.F., Bjurström, J., Mai, X.M., Jenmalm, M.C. (2003) Allergen-induced cytokine secretion in atopic and non-atopic asthmatic children. *Pediatric Allergy and Immunology*. 14(5):345-350.
42. Bottema, R. W., Kerkhof, M., Reijmerink, N. E., Koppelman, G. H., Thijs, C., Stelma, F. F., Smit, H. A. (2010) X-chromosome Forkhead Box P3 polymorphisms associate with atopy in girls in three Dutch birth cohorts. *Allergy*. Jul; 65(7):865-874.
43. Bousquet, J., Cour, P., Guérin, B., Michel, F.B. (1984) Allergy in the Mediterranean area. I. Pollen counts and pollinosis of Montpellier. *Clinical Allergy*. May; 14(3):249-258.
44. Bousquet, J., Guérin, B., Hewitt, B., Lim, S., Michel, F.B. (1985) Allergy in the Mediterranean area. III: Cross reactivity among Oleaceae pollens. *Clinical Allergy*. Sep; 15(5):439-448.
45. Bousquet, J., Lockey, R., Malling, H.J., Alvarez-Cuesta, E., Canonica, G.W., Chapman, M.D., Creticos, P.J., Dayer, J.M., Durham, S.R., Demoly, P.,

- Goldstein, R.J., Ishikawa, T., Ito, K., Kraft, D., Lambert, P.H., Løwenstein, H., Müller, U., Norman, P.S., Reisman, R.E., Valenta, R., Valovirta, E., Yssel, H. (1998) Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American academy of Allergy, Asthma and Immunology. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. Nov; 81(5 Pt 1):401-405.
46. Boyce, J.A. (2008) Eicosanoids in asthma, allergic inflammation, and host defense. *Current Molecular Medicine*. 8(5):335-349.
 47. Brinkmann, V., Heusser, C.H. (1993) T cell-dependent differentiation of human B cells into IgM, IgG, IgA, or IgE plasma cells: high rate of antibody production by IgE plasma cells, but limited clonal expansion of IgE precursors. *Cellular Immunology*. 152(2):323-332.
 48. Bruhn, S., Katzenellenbogen, M., Gustafsson, M., Krönke, A., Sönnichsen, B., Zhang, H., Benson, M. (2012) Combining gene expression microarray- and cluster analysis with sequence-based predictions to identify regulators of IL-13 in allergy. *Cytokine*. Dec; 60(3):736-740.
 49. Brutsche, M.H., Joos, L., Carle Brutsche, I.E., Bissinger, R., Tamm, M., Custovic, A., Woodcock, A. (2002) Array-based diagnostic gene-expression score for atopy and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 109(2):271-273.
 50. Busse, W.W., Gern, J.E. (1997) Viruses in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Aug; 100(2):147-150.
 51. Caig, P., Ferrer, M., Muñoz-Lejarazu, D., Ileonart, R., García-Abujeta, J.L., Caballero, T., Rodríguez, A., Echechipia, S., Martínez-Cocera, C., Domingues, F.J., Gonzalo, M.A., Olona, M. (2004) Prevalencia de alergia en la población adulta española. *Alergología e Inmunología Clínica*. 19: 68-74.
 52. Cappella, A., Durham, S.R. (2012) Allergen immunotherapy for allergic respiratory diseases. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. Oct; 8(10):1499-512.
 53. Cárdbaba, B., Aguerri M, Calzada D., Lahoz C. (2012) New Challenges for Old Diseases: The Impact of -Omics Technologies in the Understanding of Allergic Diseases. *Allergic Diseases - Highlights in the Clinic, Mechanisms and Treatment*, ISBN 978-953-51-0227-4.
 54. Cárdbaba, B., Del Pozo, V., Jurado, A., Gallardo, S., Cortegano, I., Arrieta, I., Del Amo, A., Tramón, P., Florido, F., Sastre, J., Palomino, P., Lahoz, C. (1998) Olive pollen allergy: searching for immunodominant T-cell epitopes on the Ole e 1 molecule. *Clinical and Experimental Allergy*. Apr; 28(4):413-422.
 55. Cárdbaba, B., Llanes, E., Chacártegui, M., Sastre, B., López, E., Mollá, R., del Pozo, V., Florido, F., Quirarte, J., Palomino, P., Lahoz, C. (2007) Modulation of allergic response by gene-environment interaction: olive pollen allergy. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 17 (Suppl 1):31-35.
 56. Cárdbaba, B., Vilches, C., Martín, E., de Andrés, B., del Pozo, V., Hernández, D., Gallardo, S., Fernández, J.C., Villalba, M., Rodríguez, R. (1993) DR7 and DQ2 are positively associated with immunoglobulin-E response to the main antigen of olive pollen (Ole e I) in allergic patients. *Human Immunology*. Dec; 38(4):293-299.

57. Carlson, M., Håkansson, L., Kämpe, M., Stålenheim, G., Peterson, C., Venge, P. (1992) Degranulation of eosinophils from pollen-atopic patients with asthma is increased during pollen season. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Jan; 89(1 Pt 1):131-139.
58. Caro Rebollo, J., Moneo Hernández, M.I., Cabañas Bravo, M.J., Garín Moreno, A.L., Oliván Ota, M.P., Cenarro Guerrero, M.T. (2010) Valoración del estudio alérgico en niños con atopía. *Revista Pediatría de Atención Primaria*. 12:227-237.
59. Carreira, J., Polo, F. (1995) The allergens of *Olea europea* and *Parietaria* spp. and their relevance in the Mediterranean area. *ACI News*. 7: 79.
60. Chaib, H., Cockrell, E.K., Rubin, M.A., Macoska, J.A. (2001) Profiling and verification of gene expression patterns in normal and malignant human prostate tissues by cDNA microarray analysis. *Jan-Feb*; 3(1):43-52.
61. Chamberland, A., Madore, A.M., Tremblay, K., Laviolette, M., Laprise, C. (2009) A comparison of two sets of microarray experiments to define allergic asthma expression pattern. *Experimental Lung Research*. Jun; 35(5):399-410. Erratum en: *Experimental Lung Research*. 2009. Aug; 35(6):539.
62. Chambers, V.V., Glaser, J. (1958) The incidence of subsequent ragweed pollinosis in symptom-free persons having positive reactions to ragweed pollen extract. *Journal of Allergy*. 29(3):249-257.
63. Chen, M., C. Tischer, M. Schnappinger, Heinrich, J. (2010) The role of cats and dogs in asthma and allergy—a systematic review. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 213(1): 1–31.
64. Chen, R., Stahl, E.A., Kurreeman, F.A., Gregersen, P.K., Siminovitch, K.A., Worthington, J., Padyukov, L., Raychaudhuri, S. (2011) Fine mapping the TAGAP risk locus in rheumatoid arthritis. *Genes and Immunity*. 12(4): 314-318.
65. Chen, Z., Lin, F., Gao, Y., Li, Z., Zhang, J., Xing, Y., Deng, Z., Yao, Z., Tsun A., Li, B.(2011) FOXP3 and ROR γ t: transcriptional regulation of Treg and Th17. *International Immunopharmacology*. May; 11(5):536-542.
66. Chiba, Y., Todoroki, M., Misawa, M. (2010) Phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) and STAT1, but not STAT3, induced by antigen inhalation in bronchial smooth muscles of sensitized mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 33(1):146-149.
67. Christ, M., McCartney-Francis, N.L., Kulkarni, A.B., Ward, J.M., Mizel, D.E., Mackall, C.L., Gress, R.E., Hines, K.L., Tian, H., Karlsson, S. (1994) Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice. *Journal of Immunology*. Sep; 153(1):1936-1946.
68. Cooper, G. S., Bynum, M. L.K., Somers, E. C. (2009) Recent Insights in the Epidemiology of Autoimmune Diseases: Improved Prevalence Estimates and Understanding of Clustering of Diseases. *Journal of Autoimmunology*. Nov–Dec; 33(3-4): 197–207.
69. Corsico, R. (1993). El asma polínico en Europa. Polen atmosférico en Europa. UCB, S. A Bruselas. Pags 19-29.
70. Cortés, X., Soriano, J.B., Sánchez-Ramos, J.L., Azofra, J., Almar, E., Ramos, J. (1998) Estudio Europeo del Asma. Prevalencia de atopía en adultos jóvenes de 5 áreas españolas. *Medicina Clínica (Barc)*. 111:573-577.
71. Coulter, E.M., Jenkinson, C., Farrell, J., Lavergne, S.N., Pease, C., White, A., Aleksic, M., Basketter, D. (2010) Measurement of CD4+ and CD8+ T-lymphocyte cytokine secretion and gene expression changes in p-

- phenylenediamine allergic patients and tolerant individuals. *Journal of Investigative Dermatology*. 130(1):161-174.
72. Coyle, A.J., Le Gros, G., Bertrand, C., Tsuyuki, S., Heusser, C.H., Kopf, M. (1995) Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity. *American Journal of Respiratory and Cell Molecular Biology*. 13(1):54-59.
 73. D'Amato, G., Mullins, J., Nolard, N. (1988) City spore concentrations in the European Economic Community (EEC). VII. Oleaceae (*Fraxinus*, *Ligustrum*, *Olea*). *Clinical Allergy*. Nov; 18 (6): 541-547.
 74. D'Amato, G., Liccardi, G. (1994) Pollen-related allergy in the European Mediterranean area. *Clinical and Experimental Allergy*. Mar; 24(3):210-219.
 75. Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.C., Khoury S., Oukka, M., Kuchroo, V.K. (2008) IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3⁺ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9⁺ IL-10⁺ Foxp3(-) effector T cells. *Nature Immunology*. Dec; 9(12):1347-1355.
 76. Davies, R.R., Smith, L.P. (1973) Forecasting the start and severity of the hay fever season. *Clinical Allergy*. Sep;3(3):263-267.
 77. De Cesare, F., Pini, C., Di Felice, G., Caiaffa, M.F., Macchia, L., Tursi, A., Tinghino, R., Palumbo, S., Sallusto, F., Federico, R. (1993) Purification and fine characterization of a major allergen from *Olea europaea* pollen extract. *Allergy*. 48(4):248-254.
 78. Delgado, M., Ganea, D. (2001) Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by VIP and PACAP in vitro and in vivo. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 109(4):377-82.
 79. Delgado, M., Ganea, D. (2003) Vasoactive intestinal peptide inhibits IL-8 production in human monocytes by downregulating nuclear factor kappaB-dependent transcriptional activity. *Biochemical and Biophysical Respiratory Communications*. 302(2):275-283.
 80. Delgado, M., Reduta, A., Sharma, V., Ganea, D. (2004) VIP/PACAP oppositely affects immature and mature dendritic cell expression of CD80/CD86 and the stimulatory activity for CD4(+) T cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 75(6):1122-1130.
 81. Di Lorenzo G, Mansueto P, Pacor ML, Rizzo M, Castello F, Martinelli N, Ditta V, Lo Bianco C, Leto-Barone MS, D'Alcamo A, Di Fede G, Rini GB, Ditto AM (2009) Evaluation of serum s-IgE/total IgE ratio in predicting clinical response to allergen-specific immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. May; 123(5):1103-1110.
 82. Doan, T., Melvold, R., Viselli, S., Waltenbaugh, C. (2007) Lippincott's Illustrated Reviews: Immunology. ISBN-10/ASIN: 0781795435. Lippincott Williams&Wilkins.
 83. Donfack, J., Tsalenko, A., Hoki, D.M., Parry, R., Solway, J., Lester, L.A., Ober, C. (2000) HLA-DRB1*01 alleles are associated with sensitization to cockroach allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. May; 105(5):960-966.
 84. Dorsam, G.P., Hoselton, S.A., Sandy, A.R., Samarasinghe, A.E., Vomhof-Dekrey, E.E., Dorsam, S.T., Schuh, J.M. (2010) Gene expression profiling and network analysis of peripheral blood monocytes in a chronic model of allergic asthma. *Microbiology Immunology*. Sep; 54(9):559-563.

85. Duarte, J. H., Zelenay, S., Bergman, M. L., Martins, A. C., Demengeot, J. (2009) Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *European Journal of Immunology*. Apr; 39(4): 948–955.
86. Duffy, D.L., Martin, N.G., Battistutta, D. (1990) Genetics of asthma and hay fever in Australian twins. *American Review of Respiratory Disease*. Dec; 142(6 Pt 1): 1351-1358.
87. Durham, S.R., Till, S.J. (1998) Immunologic changes associated with allergen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 102(2): 157-164.
88. Duroudier, N.P., Tulah, A.S., Sayers, I. (2009) Leukotriene pathway genetics and pharmacogenetics in allergy. *Allergy*. 64(6):823-839.
89. EAACI (1989) Skin tests used in type I allergy testing Position paper. Sub-Committee on Skin Tests of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy*. 44(S) 10:1-59.
90. Ebner, C., Siemann, U., Bohle, B., Willheim, M., Wiedermann, U., Schenk, S., Klotz, F., Ebner, H., Kraft, D., Scheiner, O. (1997) Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clinical and Experimental Allergy*. Sep; 27(9):1007-1015.
91. Elbers, C.C., van Eijk, K.R., Franke, L., Mulder, F. (2009) Using Genome-Wide Pathway Analysis to Unravel the Etiology of Complex Diseases. *Genetic Epidemiology*. 33(5): 419–431.
92. Fallarino, F., Volpi, C., Fazio, F., Notartomaso, S., Vacca, C., Busceti, C., Biciato, S., Battaglia, G., Bruno, V., Puccetti, P., Fioretti, M.C., Nicoletti, F., Grohmann, U., Di Marco, R. (2010) Metabotropic glutamate receptor-4 modulates adaptive immunity and restrains neuroinflammation. *Nature Medicine*. Aug; 16(8):897-902.
93. Faraggi, D., Reiser, B., Schisterman, E. F. (2003) ROC curve analysis for biomarkers based on pooled assessments. *Statistics in Medicine*. 15; 22(15): 2515–2527.
94. Fellows, E., Gil-Parrado, S., Jenne, D.E., Kurschus, F.C. (2007) Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program. *Blood*. 110(2): 544-552.
95. Fernández, P. S., Diaz, S.P. (2003) Pruebas diagnosticas: Sensibilidad y especificidad. *Unidad de Epidemiologia Clinica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (España). Cuadernos de Atención Primaria*. 10:120-124.
96. Fernandez-Caldas, E., Carnes, J., Iraola, V., Casanovas, M. (2007) Comparison of the allergenicity and Ole e 1 content of 6 varieties of *Olea europaea* pollen collected during 5 consecutive years. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. 98(5):464-470.
97. Fjellbirkeland, L., Cambier, S., Broaddus, V.C., Hill, A., Brunetta, P., Dolganov, G., Jablons, D., Nishimura, S.L. (2003) Integrin α v β 8-mediated activation of transforming growth factor- β inhibits human airway epithelial proliferation in intact bronchial tissue. *American Journal of Pathology*. Aug; 163(2): 533-542.
98. Florido, J.F., Delgado, P.G., de San Pedro, B.S., Quiralte, J., de Saavedra, J.M., Peralta, V., Valenzuela, L.R. (1999) High levels of *Olea europaea*

- pollen and relation with clinical findings. *International Archives of Allergy and Immunology*. Jun; 119(2):133-137.
99. Fontenot, J.D., Gavin, M.A., Rudensky, A.Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature Immunology*. Apr; 4(4):330-336.
 100. Freeman, J. (1930) "Rush" inoculation. *Lancet*; 1:744.
 101. Freire-Garabal, M., Nunez, M.J., Balboa, J., Lopez-Delgado, P., Gallego, R., Garcia-Caballero, T., Fernandez-Roel, M.D., Brenlla, J., Rey-Mendez, M. (2003) Serotonin upregulates the activity of phagocytosis through 5-HT_{1A} receptors. *British Journal of Pharmacology*. 139(2): 457-463.
 102. Fujita, H., Soyka, M.B., Akdis, M., Akdis, C.A. (2012) Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clinical and Translational Allergy*. Jan 5; 2(1):2.
 103. Gabrielsson, S., Söderlund, A., Paulie, S., van der Pouw Kraan, T.C., Troye-Blomberg, M., Rak, S. (2001) Specific immunotherapy prevents increased levels of allergen-specific IL-4- and IL-13-producing cells during pollen season. *Allergy*. Apr; 56(4):293-300.
 104. Gaig, P., Ferrer, M., Muñoz - Lejarazu, D., Leonart, R., García - Abujeta, J.L., Caballero, T., Rodríguez, A., Echechipia, S., Martínez-Cocera, C., Domínguez, F. J., Gonzalo, M. A., Olona, M. (2004) Prevalencia de alergia en la población adulta española. *Alergología e Inmunología Clínica*. (19):7.
 105. Gao, P.S., Kawada, H., Kasamatsu, T., Mao, X.Q., Roberts, M.H., Miyamoto, Y., Yoshimura, M., Saitoh, Y., Yasue, H., Nakao, K., Adra, C.N., Kun, J.F., Moro-oka, S., Inoko, H., Ho, L.P., Shirakawa, T., Hopkin, J.M. (2000) Variants of NOS1, NOS2, and NOS3 genes in asthmatics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Jan 27; 267(3):761-763.
 106. Garantziotis, S., Schwartz, D. A. (2010) Ecogenomics of Respiratory Diseases of Public Health Significance. *Annual Review of Public Health*. 31: 37-51.
 107. García, B.E., Sanz, M.L., Gato, J.J., Fernandez, J., Oehling, A. (1993) IgG4 blocking effect on the release of antigen-specific histamine. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 3(1):26-33.
 108. García, D.P. (1999) Inhale deeply ... it's safe. *Journal of the Kentucky Medical Association*. Jan; 97(1):27-28.
 109. Ge, H., Walhout, A.J., Vidal, M. (2003) Integrating 'omic' information: a bridge between genomics and systems biology. *Trends in Genetics*. Oct; 19(10):551-560.
 110. Geller-Bernstein, C., Arad, G., Keynan, N., Lahoz, C., Cardaba, B., Waisel, Y. (1996) Hypersensitivity to pollen of *Olea europaea* in Israel. *Allergy*. May; 51(5):356-359.
 111. Geller-Bernstein, C., Lahoz, C., Cárdbaba, B. (2002) Is it "bad hygiene" to inhale pollen early life? *Allergy*. 57; 71: 43-46.
 112. Gioulekas, D., Chtzigeorgiou, G., Likogiannis, S., Papakosta, D, Mpalaftoutis, C., Spiexsma F. (1991) *Olea europaea* 3-year pollen record in the area of Thessaliniki, Greece and its sensitizing significance. *Aerobiología*. 7:57.
 113. Gleich, G.J. (2000) Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 105(4):651-663.
 114. Gleich, G.J., Zimmermann, E.M., Henderson, L.L., Yunginger, J.W. (1982) Effect of immunotherapy on immunoglobulin E and immunoglobulin G

- antibodies to ragweed antigens: a six-year prospective study. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 70(4):261-271.
115. Goldberg, A. C., Goldberg-Eliaschewitz, F., Sogayar, M. C., Genre, J., Rizzo, L.V. (2009) Leptin and the immune response: an active player or an innocent bystander? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1153: 184–192.
 116. Gri, G., Piconese, S., Frossi, B., Manfroi, V., Merluzzi, S., Tripodo, C., Viola, A. (2008) CD4+CD25+regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction. *Immunity*. 29(5): 771–781.
 117. Groneberg, D.A., Folkertsb, G., Peisera, C., Chungc, K. F., Fischer, A. (2004) Neuropeptide Y (NPY). *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*. 17(4):173–180.
 118. Groneberg, D.A., Rabe, K.F., Fischer, A. (2006) Novel concepts of neuropeptide-based drug therapy: vasoactive intestinal polypeptide and its receptors. *European Journal of Pharmacology*. 533(1-3):182–194.
 119. Gumral, N., Caliskan, S., Ozgüner, F., Kaleli, S., Akkaya, A., Yilmaz, H., Sen, S. (2009) Melatonin levels and enzymatic antioxidant defense system decrease in blood of patients with bronchial asthma. *Toxicology and industrial health*. 25(6): 411-416.
 120. Gupta, R.A., Brockman, J.A., Sarraf, P., Willson, T.M., DuBois, R.N. (2001) Target genes of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in colorectal cancer cells. *The Journal of Biology Chemistry*. Aug 10; 276(32):29681-29687.
 121. Hagy, G.W., Settupane, G.A. (1971) Prognosis of positive allergy skin tests in an asymptomatic population. A three year follow-up of college students. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 48(4):200-211.
 122. Hall, B.M. (1985) Mechanisms maintaining enhancement of allografts. I. Demonstration of a specific suppressor cell. *Journal of Experimental Medicine*. Jan 1; 161(1):123-133.
 123. Hall, G., Houghton, C.G., Rahbek, J.U. (2003) Suppression of allergen reactive Th2 mediated responses and pulmonary eosinophilia by intranasal administration of an immunodominant peptide is linked to IL-10 production. *Vaccine*. Jan 17; 21(5-6):549–561.
 124. Hamid, Q.A. (1997) Peripheral inflammation is more important than central inflammation. *Respiratory Medicine*. Nov; 91 Suppl A:11-12.
 125. Hansel, N.N., Cheadle, C., Diette, G.B., Wright, J., Thompson, K.M., Barnes, K.C., Georas, S.N. (2008) Analysis of CD4+ T-cell gene expression in allergic subjects using two different microarray platforms. *Allergy*. Mar; 63(3):366-369.
 126. Hartemink, A.J., Gifford, D.K., Jaakkola, T.S., Young, R.A. (2001) Using graphical models and genomic expression data to statistically validate models of genetic regulatory networks. *Pacific Symposium on Biocomputing*. 422-433.
 127. Hasegawa, K., Tamari, M., Shao, C., Shimizu, M., Takahashi, N., Mao, X.Q., Yamasaki, A., Kamada, F., Doi, S., Fujiwara, H., Miyatake, A., Fujita, K., Tamura, G., Matsubara, Y., Shirakawa, T., Suzuki, Y. (2004) Variations in the C3, C3a receptor, and C5 genes affect susceptibility to bronchial asthma. *Human Genetics*. Sep; 115(4):295-301.

128. Hattevig, G., Kjellman, B., Björkstén, B. (1987) Clinical symptoms and IgE responses to common food proteins and inhalants in the first 7 years of life. *Clinical Allergy*. Nov; 17(6):571-578.
129. Hebenstreit, D., Giaisi, M., Treiber, M. K., Zhang, X. B., Mi, H. F., Horejs-Hoeck, J., Andersen, K. G. (2008) LEF-1 negatively controls interleukin-4 expression through a proximal promoter regulatory element. *Journal of Biological Chemistry*. 283(33): 22490–22497.
130. Hesselmar, B., Aberg, B., Eriksson, B. (2003) High-dose exposure to cat is associated with clinical tolerance: a modified Th2 immune response? *Clinical and Experimental Allergy*. Dic; 33(12): 1681-1685.
131. Hizawa, N., Yamaguchi, E., Jinushi, E., Kawakami, Y. (2000) A common FCER1B gene promoter polymorphism influences total serum IgE levels in a Japanese population. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. Mar; 161(3 Pt 1):906-909.
132. Holloway, J.W., Yang, I.A., Holgate, S.T. J (2010) Genetics of allergic disease. *Allergy and Clinical Immunology*. Feb; 125(2 Suppl 2):S81-94.
133. Holt, P.G., Leivers, S. (1983) Radiation-resistant IgE-secreting cells in the mouse: susceptibility to suppressor T cells. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*. 71(2):188–190.
134. Holt, P.G., Sedgwick, J.D., O’Leary, C., Krska, K., Leivers, S. (1984) Long-lived IgE- and IgG-secreting cells in rodents manifesting persistent antibody responses. *Cellular Immunology*. 89(2):281–289.
135. Hopp, R.J., Bewtra, A.K., Watt, G.D. (1984) Genetic analysis of allergic disease in twins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 73(2): 265-270.
136. Horak, F. (1985) Manifestation of allergic rhinitis in latent-sensitized patients. A prospective study. *Archives of Otorhinolaryngology*. 242(3):239-245.
137. Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. Feb 14; 299(5609):1057-1061.
138. Hoshino, M., Izumi, T., Shimizu, T. (1998) Leukotriene D4 activates mitogen-activated protein kinase through a protein kinase Calpha-Raf-1-dependent pathway in human monocytic leukemia THP-1 cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 273(9): 4878-4882.
139. Howard, T.D., Koppelman, G.H., Xu, J., Zheng, S.L., Postma, D.S., Meyers, D.A., Bleecker, E.R. (2002) Gene-gene interaction in asthma: IL4RA and IL13 in a Dutch population with asthma. *The American Journal of Human Genetics*. Jan; 70(1):230-236.
140. Huecas, S., Villalba, M., Gonzalez, E., Martinez-Ruiz, A., Rodriguez, R. (1999) Production and detailed characterization of biologically active olive pollen allergen Ole e 1 secreted by the yeast *Pichia pastoris*. *European Journal of Biochemistry*. 261(2):539-546.
141. Idzko, M., Hammad, H., van Nimwegen, M., Kool, M., Müller, T., Soullié, T., Willart, M.A., Hijdra, D. (2006) Local application of FTY720 to the lung abrogates experimental asthma by altering dendritic cell function. *The Journal of Clinical Investigation*. 116(11): 2935- 2944.
142. IHGSC - International Human Genome Sequencing Consortium (2004) National Human Genome Research Institute (NHGRI).

143. Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., Speed, T.P. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 4(2):249-264.
144. Izuhara, K., Saito, H. (2006) Microarray-based identification of novel biomarkers in asthma. *Allergology International*. 55(4): 361-367.
145. Jaffar, Z., Ferrini, M. E., Girtsman, T. A., Roberts, K. (2009) Antigen-specific Treg regulate Th17-mediated lung neutrophilic inflammation, B-cell recruitment and polymeric IgA and IgM levels in the airways. *European Journal of Immunology*. 39(12): 3307–3314.
146. Johnson, M.A., Perez-Amador, M.A., Lidder, P., Green, P.J. (2000) Mutants of *Arabidopsis* defective in a sequence-specific mRNA degradation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* Dec 5; 97(25):13991-13996.
147. Jones, S.M., Pons, L., Roberts, J.L., Scurlock, A.M., Perry, T.T., Kulis, M., Shreffler, W.G., Steele, P., Henry, K.A., Adair, M., Francis, J.M., Durham, S., Vickery, B.P., Zhong, X., Burks, A.W. (2009) Clinical efficacy and immune regulation with peanut oral immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Aug; 124(2):292-300.
148. Jutel, M., Akdis, M., Budak, F., Aebischer-Casaulta, C., Wrzyszczy, M., Blaser, K., Akdis, C. A. (2003) IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *European Journal of Immunology*. 33(5): 1205–1214.
149. Kabbur, P.M., Carson, W.F., Guernsey, L. (2006) Interleukin-10 does not mediate inhalational tolerance in a chronic model of ovalbumin-induced allergic airway disease. *Cellular Immunology*. Jan; 239(1):67–74.
150. Kalampokis, I., Yoshizaki, A., Tedder, T.F. (2013) IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Research and Therapy*. 15(Suppl 1):S1.
151. Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y., Hattori, M. (2004) The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Respiratory*. Jan 1; 32(Database issue):D277-280.
152. Katelaris, C.H., Lee, B.W., Potter, P.C., Maspero, J.F., Cingi, C., Lopatin, A., Saffer, M., Xu, G., Walters, R.D. (2012) Prevalence and diversity of allergic rhinitis in regions of the world beyond Europe and North America. *Clinical and Experimental Allergy*. Feb; 42(2):186-207.
153. Kawamura, N., Tamura, H., Obana, S., Wenner, M., Ishikawa, T., Nakata, A., Yamamoto, H. (1998) Differential effects of neuropeptides on cytokine production by mouse helper T cell subsets. *Neuroimmunomodulation*. 5(1-2): 9–15.
154. Kendzierski, C.M., Irizarry, R.A., Chen, K.S., Haag, J.D., Gould. M.N. (2005) On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Mar; 102(12):4252–4257.
155. Kerkhof, M., Droste, J.H.J., de Monchf, J.G.R., Schouten, J.P., Rijcken, B. (1996) Distribution of total serum IgE and specific IgE to common aeroallergens by sex and age, and their relationship to each other in a random sample of the Dutch general U population aged 20-70 years. *Allergy*. 51(11): 770-776.

156. Khan, J., Wei, J.S., Ringner, M., Saal, L.H., Ladanyi, M., Westermann, F., Berthold, F., Schwab, M., Antonescu, C.R., Peterson, C., Meltzer, P.S. (2001) Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nature Medicine*. Jun; 7(6):673–679.
157. Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., Ramsdell, F. (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nature Immunology*. Apr; 4(4):337-342.
158. Kim, J.W., Dang, C.V. (2005) Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends in Biochemical Sciences*. Mar; 30(3):142–150.
159. Klimek, L., Dormann, D., Jarman, E.R., Cromwell, O., Riechelmann, H., Reske-Kunz, A.B. (1999) Short-term preseasonal birch pollen allergoid immunotherapy influences symptoms, specific nasal provocation and cytokine levels in nasal secretions, but not peripheral T-cell responses, in patients with allergic rhinitis.. *Clinical and Experimental Allergy*. Oct; 29(10):1326-35.
160. Klunker, S., Chong, M. M., Mantel, P. Y., Palomares, O., Bassin, C., Ziegler, M., Ruckert, B. (2009) Transcription factors RUNX1 and RUNX3 in the induction and suppressive function of Foxp3+inducible regulatory T cells. *Journal of Experimental Medicine*. Nov 26; 206(12): 2701–2715.
161. Knox, R.B., Suphioglu, C., Taylor, P., Desai, R., Watson, H.C., Peng, J.L., Bursill, L.A. (1997) Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clinical Experimental Allergy*. Mar; 27(3):246-251.
162. Kong, W.J., Chen Wang, Y. (2012) A population-based 5-year follow-up of allergic rhinitis in Chinese children. *American Journal of Rhinology and Allergy*. Jul-Aug; 26(4): 315–320.
163. Konig, B., Bergmann, U., Konig, W. (1992) Induction of inflammatory mediator release (serotonin and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid) from human platelets by *Pseudomonas aeruginosa* glycolipid. *Infection and Immunity*. 60(8): 3150–3155.
164. Koski, G. K., Kariko, K., Xu, S., Weissman, D., Cohen, P. A., Czerniecki, B. J. (2004) Cutting edge: innate immune system discriminates between RNA containing bacterial versus eukaryotic structural features that prime for high-level IL-12 secretion by dendritic cells. *Journal of Immunology*. 172(7): 3989–3993.
165. Kotturi, M.F., Hunt, S.V., Jefferies, W.A. (2006) Roles of CRAC and Cav-like channels in T cells: more than one gatekeeper? *Trends in Pharmacologic Science*. Jul; 27(7):360–367.
166. Kroeger, E., Stephens, N.L. (1971) Effect of hypoxia on energy and calcium metabolism in airway smooth muscle. *American Journal of Physiology*; 220:1199–1204.
167. Kulkarni, A.B., Huh, C.G., Becker, D., Geiser, A., Lyght, M., Flanders, K.C., Roberts, A.B., Sporn, M.B., Ward, J.M., Karlsson, S. (1993) Transforming growth factor β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* Jan 15; 90(2):770-774.
168. Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2009) Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Oct 30; 388(4):621-625.

169. Kuperman, D. A., Schleimer, R. P. (2008) Interleukin-4, interleukin-13, signal transducer and activator of transcription factor 6, and allergic asthma. *Current Molecular Medicine*. Aug; 8(5): 384–392.
170. Kurt, E., Aktas, A., Gulbas, Z., Erginel, S., Arslan, S. (2010) The effects of natural pollen exposure on inflammatory cytokines and their relationship with nonspecific bronchial hyperresponsiveness in seasonal allergic rhinitis. *Allergy and Asthma Proceedings*. Mar-Apr; 31(2):126-31.
171. Kuwano, K., Yoshimi, M., Maeyama, T., Hamada, N., Yamada, M., Nakanishi, Y. (2005) Apoptosis signaling pathways in lung diseases. *Medical Chemistry*. 1(1): 49-56.
172. Lahoz, C., Lauzurica, P., Tricas, L., Diez, R., Maruri, N., Galocha, B., Florez, R., Maestre, Y., Gurbindo, C., Garcia, R. (1985) A glycoprotein as the major antigen in *Olea europaea*. *Annals of Allergy*. 55: 289.
173. Laitinen, T., Polvi, A., Rydman, P., Vendelin, J., Pulkkinen, V., Salmikangas, P., Mäkelä, S., Rehn, M., Pirskanen, A., Rautanen, A., Zucchelli, M., Gullstén, H., Leino, M., Alenius, H., Petäys, T., Haahtela, T., Laitinen, A., Laprise, C., Hudson, T.J., Laitinen, L.A., Kere, J. (2004) Characterization of a common susceptibility locus for asthma-related traits. *Science*. Apr 9; 304(5668):300-304.
174. Larché, M., Akdis, C. A., Valenta, R. (2006) Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews Immunology*. Oct; 6(10):761-771.
175. Larché, M., Robinson, D.S., Kay, A.B. (2003) The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Mar; 111(3):450-463.
176. Lauenstein, D., Quarcoo, D., Plappert, L., Schleh, C., M. Nassimi, C. Pilzner, Rochlitzer, S., Brabet, P., T. Welte, H. G. Hoymann, N. Krug, M. Müller, E. A. Lerner, A. Braun, Groneberg, D.A (2011) Pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor 1 mediates anti-inflammatory effects in allergic airway inflammation in mice. *Clinical and Experimental Allergy*. Apr; 41(4):592-601.
177. Lauzurica, P., Gurbindo, C., Maruri, N., Galocha, B., Díaz, R., González, J., García, R. y Lahoz, C. (1988a) Olive (*Olea europaea*) pollen allergens-I. Immunochemical characterization by immunoblotting, CRIE and immunodetection by a monoclonal antibody. *Molecular Immunology*. 25: 329.
178. Lauzurica, P., Maruri, N., Galocha, B., Gonzalez, J., Diaz, R., Palomino, P., Hernandez, D., García, R., Lahoz, C. (1988b) Olive (*Olea europea*) pollen allergens--II. Isolation and characterization of two major antigens. *Molecular Immunology*. Apr; 25(4):337-344.
179. Lee, J.H., Kim, J.W., Kim do, K., Kim, H.S., Park, H.J., Park, D.K., Kim, A.R., Kim, B. (2011) The Src family kinase Fgr is critical for activation of mast cells and IgE-mediated anaphylaxis in mice. *Journal of Immunol*. 187(4): 1807-1815.
180. Lee, J.H., Moore, J.H., Park, S.W., Jang, A.S., Uh, S.T., Kim, Y.H., Park, C.S., Park, B.L., Shin, H.D. (2008) Genetic interactions model among Eotaxin gene polymorphisms in asthma. *Journal of Human Genetics*. 53(10):867-875.
181. Lewis, C.C., Aronow, B., Hutton, J., Santeliz, J., Dienger, K., Herman, N., Finkelman, F.D., Wills.Karp, M. (2009) Unique and overlapping gene

- expression patterns driven by IL-4 and IL-13 in the mouse lung. *Journal of Clinical Immunology*. 123(4): 795-804.
182. Lewis, T.S., Shapiro, P.S., Ahn, N.G. (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advance in Cancer Research*. 74:49–139.
 183. Li, C., Hung Wong, W. (2001) Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biology*. 2(8):3.
 184. Li, X., Howard, T.D., Zheng, S.L. (2010) Genome-wide association study of asthma identifies RAD50-IL13 and HLA-DR/DQ regions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 125(2):328.e11–335.e11.
 185. Liccardi, G., D'Amato, M., D'Amato, G. (1996a) Oleaceae pollinosis: a review. *International Archives of Allergy and Immunology*. Nov; 111(3):210-217.
 186. Liccardi, G., Kordash, T.R., Russo, M., Noschese, P., Califano, C., D'Amato, M. y D'Amato, G. (1996b) Why are nasal and bronchial symptoms mostly perennial in patients with monosensitization to *Olea europaea* pollen allergens? *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. Nov-Dec; 6(6):371-377.
 187. Liu, Y.C. (2007) The E3 ubiquitin ligase Itch in T cell activation, differentiation, and tolerance. *Seminars in Immunology*. Jun; 19(3):197-205.
 188. Llanes, E., Quiralte, J., López, E., Sastre, B., Chacártegui, M., del Pozo, V., Palomino, P., Lahoz, C., Cárdbaba, B. (2008) Analysis of polymorphisms in olive pollen allergy: IL13, IL4RA, IL5 and ADRB2 genes. *International Archives of Allergy and Immunology*. 148(3):228-238.
 189. Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., Brown, E.L. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature Biotechnology*. Dec; 14(13):1675-1680.
 190. Lødrup, C., Roll, S., Carlsen, K.H., Mowinckel, P., Wijga, A.H., Brunekreef, B., Torrent, M., Roberts, G., Arshad, S.H., Kull, I., Krämer, U., von Berg, A., Eller, E., Høst, A., Kuehni, C., Spycher, B., Sunyer, J., Chen, C.M., Reich, A., Asarnoj, A., Puig, C., Herbarth, O., Mahachie, J., Van Steen, K., Willich, S.N., Wahn, U., Lau, S., Keil, T. (2012) Does pet ownership in infancy lead to asthma or allergy at school age? Pooled analysis of individual participant data from 11 European birth cohorts. *PLoS One*. 7(8):e43214.
 191. Luna, J.J., Riesewijk, A., Horcajadas, J.A., Van Os Rd. Rd., Domínguez, F., Mosselman, S., Pellicer, A., Simón, C. (2004) Gene expression pattern and immunoreactive protein localization of LGR7 receptor in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Molecular Human Reproduction*. Feb; 10(2):85-90.
 192. Macchia, L., Caiaffa, M.F., D'Amato, Tursi, A. (1991) Allergenic significance of Oleaceae pollen. *Allergenic pollen and pollinosis in Europe*. London: Blackwell scientific Publications. Pags: 87-93.
 193. Manousis, T., Moore, N.F. (1988) Exploited Plants. *Olive Tree Biologist*. 35:7-12.
 194. Mantel, P.Y., Kuipers, H., Boyman, O., Rhyner, C., Ouaked, N., Rückert, B., Karagiannidis, C., Lambrecht, B.N., Hendriks, R.W., Cramer, R., Akdis, C.A., Blaser, K., Schmidt-Weber, C.B. (2007) GATA3-driven Th2 responses

- inhibit TGF-beta1-induced FOXP3 expression and the formation of regulatory T cells. *PLoS Biology*. Dec; 5(12): e329.
195. Mao, X., Cai, T., Olyarchuk, J.G., Wei (2005) Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary. *Bioinformatics*. Oct 1; 21(19):3787-3793.
 196. Marenholz, I., Nickel, R., Ruschendorf, F., Schulz, F., Esparza-Gordillo, J., Kerscher, T. (2006) Filaggrin loss-of-function mutations predispose to phenotypes involved in the atopic march. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Oct; 118(4):866–871.
 197. Maresso, K., Broeckel, U. (2008) Genotyping Platforms for Mass-Throughput Genotyping with SNPs, Including Human Genome-Wide Scans. *Advances in Genetics*. 60:107-139.
 198. Martínez, F.D. (2007) CD14, endotoxin, and asthma risk: actions and interactions. *Proceeding of the American Thoracic Society*. Jul; 4(3):221-225.
 199. Martín-Orozco, E., Cardaba, B., del Pozo, V., de Andres, B., Villalba, M., Gallardo, S., Rodriguez-Garcia, M.I., Fernandez, M.C., Alche, J.D., Rodriguez, R. (1994) Ole e I: epitope mapping, cross-reactivity with other Oleaceae pollens and ultrastructural localization. *International Archives of Allergy and Immunology*. 104(2):160-170.
 200. Mayr, B., Montminy, M. (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2(8):599-609.
 201. Medina, I., Carbonell, J., Pulido, L., Madeira, S.C., Goetz, S., Conesa, A., Tárraga, J., Pascual-Montano, A., Nogales-Cadenas, R., Santoyo, J., García, F., Marbà, M., Montaner, D., Dopazo, J. (2010) Babelomics: an integrative platform for the analysis of transcriptomics, proteomics and genomic data with advanced functional profiling. *Journal of Nucleic Acids Research*. Jul; 38 (Web server issue):W210-213.
 202. Meiler, F., Klunker, S., Zimmermann, M., Akdis, C. A., Akdis, M. (2008a) Distinct regulation of IgE, IgG4 and IgA by T regulatory cells and toll-like receptors. *Allergy*. 63(11): 1455–1463.
 203. Meiler, F., Zumkehr, J., Klunker, S., Ruckert, B., Akdis, C. A. , Akdis, M. (2008b) In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure. *Journal of Experimental Medicine*. 205(12): 2887–2898.
 204. Meng, J.F., McFall, C., Rosenwasser, L.J. (2007) Polymorphism R62W results in resistance of CD23 to enzymatic cleavage in cultured cells. *Genes Immunology*. Apr; 8(3):215-223.
 205. Meng, J.F., Rosenwasser, L.J. (2010) Unraveling the Genetic Basis of Asthma and Allergic Diseases. *Allergy, Asthma and Immunology Research*. Oct; 2(4): 215–227.
 206. Minelli, C., Granell, R., Newson, R., Rose-Zerilli, M.J., Torrent M, Ring, S.M., Holloway, J.W., Shaheen, S.O., Henderson, J.A. (2010) Glutathione-S-transferase genes and asthma phenotypes: a Human Genome Epidemiology (HuGE) systematic review and meta-analysis including unpublished data. *International Journal of Epidemiology*. Apr; 39(2):539-562.
 207. Mobini, R., Andersson, B.A., Erjefält, J., Hahn-Zoric, M., Langston, M.A., Perkins, A.D., Cardell, L.O., Benson, M. (2009) A module-based analytical strategy to identify novel disease-associated genes shows an inhibitory role for interleukin 7 Receptor in allergic inflammation. *BMC Systems Biology*. Feb 12; 3:19.

208. Moed, H., Gerth van Wijk, R., Hendriks, R.W., van der Wouden, J.C. (2013) Evaluation of Clinical and Immunological Responses: A 2-Year Follow-Up Study in Children with Allergic Rhinitis due to House Dust Mite. *Mediators of inflammation*. 2013: 345217-345225.
209. Moffatt, M.F., Hill, M.R., Cornélis, F., Schou, C., Faux, J.A., Young, R.P., James, A.L., Ryan, G., le Souef, P., Musk, A.W. (1994) Genetic linkage of T-cell receptor alpha/delta complex to specific IgE responses. *Lancet*. Jun 25; 343(8913):1597-1600.
210. Moingeon, P. (2012) Adjuvants for allergy vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics*. Oct; 8 (10): 1492-1498.
211. Montaner, D., Dopazo, J. (2010) Multidimensional gene set analysis of genomic data. *PLoS One*. Apr 27; 5(4):e10348.
212. Morello, R., Rauch F. (2010) Role of cartilage-associated protein in skeletal development. *Current Osteoporosis Reports*. 8(2):77-83.
213. Mössner, R., Lesch, K.P. (1998) Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behaviour Immunity*. Dec; 12(4):249-271.
214. Moverare, R., Elfman, L., Björnsson, E., Stålenheim, G. (2000a) Changes in cytokine production in vivo during early phase of birch-pollen immunotherapy. *Scandinavian Journal of Immunology*. 52:200-206.
215. Moverare, R., Elfman, L., Björnsson, E., Stålenheim, G. (2000b) Cytokine production by peripheral blood mononuclear cells following birch-pollen immunotherapy. *Immunology Letters*. Jul 3; 73(1):51-56.
216. Muller, T., Durk, T., Blumenthal, B., Grimm, M., Cicko, S., Panther, E., Soricther, S., Herouy, Y., Di Virgilio, F., Ferrari, D., Norgauer, J., Idzko, M. (2009) 5-hydroxytryptamine modulates migration, cytokine and chemokine release and T-cell priming capacity of dendritic cells in vitro and in vivo. *PLoS One*. 4(7): e6453.
217. Munitz, A., Bachelet, I., Finkelman, F.D., Rothenberg, M.E., Levi-Schaffer, F. (2007) CD48 is critically involved in allergic eosinophilic airway inflammation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 175(9): 911-918.
218. Nathan, R.A., Meltzer, E.O., Derebery, J. (2008) The prevalence of nasal symptoms attributed to allergies in the United States: findings from the burden of rhinitis in an America survey. *Allergy and Asthma Proceedings*. 29(6):600–608.
219. Nockher, W.A., Renz, H. (2006) Neurotrophins and asthma: novel insight into neuro-immune interaction. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 117(1):67-71.
220. Nonaka, M., Pawankar, R., Fukumoto, A., Yagi, T. (2008) Heterogeneous response of nasal and lung fibroblasts to transforming growth factor-beta 1. *Clinical and Experimental Allergy*. 38(5): 812–821.
221. Nouri-Aria, K. T., Wachholz, P. A., Francis, J. N., Jacobson, M. R., Walker, S. M., Wilcock, L. K., Staple, S. Q. (2004) Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *Journal of Immunology*. 172(5): 3252–3259.
222. Novershtern, N., Itzhaki, Z., Manor, O., Friedman, N., Kaminski, N. (2008) A functional and regulatory map of asthma. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 38(3): 324-336.

223. Ober, C. (2005) Perspectivas on the past decade of asthma genetics. *Journal of Allergy Clinical Immunology*. Aug; 116(2):274-278.
224. Ober, C., Hoffjan, S. (2006) Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. *Genes of Immunology*. Mar; 7(2):95-100.
225. Ohme-Takagi, M., Taylor, C.B., Newman, T.C., Green, P.J. (1993) The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the U.S.A.* Dec 15; 90(24):11811-11815.
226. Ono, M., Yaguchi, H., Ohkura, N., Kitabayashi, I., Nagamura, Y., Nomura, T., Miyachi, Y. (2007) Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature*. Apr 5; 446(7136): 685–689.
227. Oryszczyn, M.P., Annesi, I., Neukirch, F., Dore, M.F., Kauffmann, F. (1995) Longitudinal observations of serum IgE and skin prick test response. *American Journal of Respiratory Critical Care Medicine*. 151(3 Pt 1):663-668.
228. Palmer, C.N., Irvine, A.D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S.P., Goudie, D.R., Sandilands, A., Campbell, L.E., Smith, F.J., O'Regan, G.M., Watson, R.M., Cecil, J.E., Bale, S.J., Compton, J.G., DiGiovanna, J.J., Fleckman, P., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Sergeant, A., Munro, C.S., El Houate, B., McElreavey, K., Halkjaer, L.B., Bisgaard, H., Mukhopadhyay, S., McLean, W.H. (2006) Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature Genetics*. Apr; 38(4):441-446.
229. Palomares, O., Swoboda, I., Villalba, M., Balic, N., Spitzauer, S., Rodriguez, R., Valenta, R. (2006) The major allergen of olive pollen ole e 1 is a diagnostic marker for sensitization to oleaceae. *International Archives of Allergy and Immunology*. 141(2):110-118.
230. Palomares, O., Yaman, G., Azkur, A.K., Akkoc, T., Akdis, M., Akdis, C.A. (2010) Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *European Journal of Immunology*. May; 40(5):1232-1240.
231. Parronchi, P., Brugnolo, F., Annunziato, F., Manuelli, C., Sampognaro, S., Mavilia, C., Romagnani, S., Maggi, E. (1999) Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4+T cells into Th1 effectors. *Journal of Immunology*. 163(11): 5946–5953.
232. Pearce, N., Douwes, J., Beasley, R. (2000) Is allergen exposure the major primary cause of asthma? *Thorax*. 55 (5): 424–431.
233. Pepper, I. (1994) *Atlas de Inmunología*. Publicaciones Técnicas Mediterráneo. <http://atlas.med.uchile.cl/>
234. Pepper, S.D., Saunders, E.K., Edwards, L.E., Wilson, C.L., Miller, C.J. (2007) The utility of MAS5 expression summary and detection call algorithms. *BMC Bioinformatics*. Jul; 30(8):273.
235. Pfeiffer, J.R., Seagrave, J.C., Davis, B.H., Deanin, G.G., Oliver, J.M. (1985) Membrane and cytoskeletal changes associated with IgE-mediated serotonin release from rat basophilic leukemia cells. *Journal of Cell Biology*. 101(6): 2145–2155.
236. Pierre S, Bats, A.S., Coumoul X. (2011) Understanding SOS (Son of Sevenless). *Biochemical Pharmacology*. 82(9): 1049–1056.

237. Pinto, L.A., Stein, R.T., Kabesch, M. (2008) Impact of genetics in childhood asthma. *Journal of Pediatrics* (Rio de Janeiro). Aug; 84(4 Suppl):S68-75.
238. Plaschke, P.P., Janson, C., Norrman, E., Bjornsson, E., Ellbjär, S., Jarvholm, B. (2000) Onset and remission of allergic rhinitis and asthma and the relationship with atopic sensitization and smoking. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 162(3 Pt 1):920-924.
239. Platts-Mills, T., Longbottom, J., Edward, J. (1987) Occupational asthma and rhinitis related to laboratory rat, serum IgG and IgE antibodies to the rat urinary allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 79(3):505-515.
240. Platts-Mills, T., Vaughan, J., Squillace, S. (2001) Sensitisation, asthma, and a modified Th2 response in children exposed to cat allergen: a population based cross-sectional study. *Lancet*. Mar 10; 357(9258): 752-756.
241. Powrie, F., Mason, D. (1990) Subsets of rat CD4⁺ T cells defined by their differential expression of variants of the CD45 antigen: developmental relationships and in vitro and in vivo functions. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 159:79-96.
242. Pozo, D., Anderson, P., Gonzalez-Rey, E. (2009) Induction of alloantigen-specific human T regulatory cells by vasoactive intestinal peptide. *Journal of Immunology*. 183(7):4346–4359.
243. Prevete, N., Salzano, F.A., Rossi, F.W., Rivellesse, F., Dellepiane, M., Guastini, L., Mora, R. (2011) Role(s) of formyl-peptide receptors expressed in nasal epithelial cells. *Journal of Biological Regulation and Homeostasis Agents*. 25(4):553-564.
244. Pucheu-Haston, C.M., Copeland, L.B., Vallanat, B., Boykin, E., Ward, M.D. (2010) Biomarkers of acute respiratory allergen exposure: screening for sensitization potential. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 244(2): 144-155.
245. Quarcoo, D., Weixler, S., Groneberg, D., Joachim, R., Ahrens, B., Wagner, A.H., Hecker, M., Hamelmann, E. (2004) Inhibition of signal transducer and activator of transcription 1 attenuates allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Aug; 114(2):288-295.
246. Quiralte, J., González, E., Arias De Saavedra, J.M., Villalba, M., Florido, J.F., Sáenz De San Pedro, B., Rodríguez, R. (2000) Immunological activity of recombinant Ole e 1 in patients with Olea europaea pollinosis. *International Archives of Allergy and Immunology*. 122(2):101-107.
247. Quiralte, J., Llanes, E., Barral, P., Arias de Saavedra, J.M., Sáenz de San Pedro, B., Villalba, M., Florido, J.F., Rodríguez, R., Lahoz, C., Cárdena, B. (2005) Ole e 2 and Ole e 10: new clinical aspects and genetic restrictions in olive pollen allergy. *Allergy*. Mar; 60(3):360-365.
248. Radulovic, S., Jacobson, M. R., Durham, S. R. and Nouri-Aria, K. T. (2008) Grass pollen immunotherapy induces Foxp3-expressing CD4⁺CD25⁺ cells in the nasal mucosa. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 12(6)1: 1467–1472.
249. Ramaswamy, S., Tamayo, P., Rifkin, R., Mukherjee, S., Yeang, C.H., Angelo, M., Ladd, C., Reich, M., Latulippe, E., Mesirov, J.P., Poggio, T., Gerald, W., Loda, M., Lander, E.S., Golub, T.R. (2001) Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* Dec; 98(26): 15149 –15154.

250. Rankin, J.A., Picarella, D.E., Geba, G.P., Temann, U.A., Prasad, B., DiCosmo, B., (1996) Phenotypic and physiologic characterization of transgenic mice expressing interleukin 4 in the lung: lymphocytic and eosinophilic inflammation without airway hyperreactivity. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the U.S.A.* 93(15):7821–7825.
251. Reed, C.E., Milton, D.K. (2001) Endotoxin-stimulated innate immunity: a contributing factor for asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 108(2): 157-66.
252. Ricciotti, E., Fitzgerald, G.A. (2011) Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 31(5): 986-1000.
253. Richardson, J.D., Vaski, M.R. (2002) Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapy.* Sep; 302(3):839-845.
254. Riedler, J., Braun-Fahrlander, C., Eder, W. (2001) Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet.* Oct 6; 358(9288): 1129-33.
255. Ring, S., Schafer, S. C., Mahnke, K., Lehr, H. A., Enk, A. H. (2006) CD4+CD25+regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue. *European Journal of Immunology.* 36(11): 2981–2992.
256. Risbano, M.G., Meadows, C.A., Coldren, C.D., Jenkins, T.J., Edwards, M.G., Collier, D., Huber, W., Mack, D.G. (2010) Altered immune phenotype in peripheral blood cells of patients with scleroderma-associated pulmonary hypertension. *Clinical and Translational Science.* 3(5):210-218.
257. Rodríguez, R., Villalba, M., Monsalve, R.I., Batanero, E. (2001) The spectrum of olive pollen allergens. *International Archives of Allergy and Immunology.* Jul; 125(3):185-195.
258. Rolph, M.S.; Sisavanh, M.; Liu, S.M., Mckay, C.R. (2006). Clues to asthma pathogenic from microarray expression studies. *Pharmacology and Therapeutics.* Jan; 109 (1-2):284-294.
259. Rubtsov, Y. P., Nieu, R. E., Josefowicz, S., Li, L., Darce, J., Mathis, D., Benoist, C., Rudensky, A.Y. (2010) Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science.* Sep 24; 329(5999): 1667–1671.
260. Sääf, A.M., Tengvall-Linder, M., Chang, H.Y., Adler, A.S., Wahlgren, C.F., Scheynius, A., Nordenskjöld, M., Bradley, M. (2008) Global expression profiling in atopic eczema reveals reciprocal expression of inflammatory and lipid genes. *PLoS One.* 3(12):e4017.
261. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology.* Aug 1; 155(3):1151-1164.
262. Sakaguchi, S., Wing, K. and Yamaguchi, T. (2009) Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *European Journal of Immunology.* 39(9): 2331–2336.
263. Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A.D., McLean, W.H. (2009) Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *Journal of Cell Science.* May; 122(Pt 1): 1285–1294.
264. Santeliz, J. V., Van Nest, G., Traquina, P., Larsen, E., Wills-Karp, M. (2002) Amb a 1-linked CpG oligonucleotides reverse established airway

- hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 109(3):455-462.
265. Sartor, M.A., Leikauf, G.D., Medvedovic (2009) M.LRpath: a logistic regression approach for identifying enriched biological groups in gene expression data. *Bioinformatics*. Jan 15; 25(2):211-217.
 266. Sayers, I., Barton, S., Rorke, S., Beghé, B., Hayward, B., Van Eerdewegh, P., Keith, T., Clough, J.B., Ye, S., Holloway, J.W., Sampson, A.P., Holgate, S.T. (2003) Allelic association and functional studies of promoter polymorphism in the leukotriene C4 synthase gene (LTC4S) in asthma. *Thorax*. May; 58(5):417-424.
 267. Schreffer, W. Lencer, D. Bardina, L., Sampson, H. (2005) Epitope mapping by microarray peptide immunoassay and cluster analysis reveals interpatient heterogeneity and a more detailed map. *Clinical Immunology*. 116(4): 893-899.
 268. Settipane, R.J., Hagy, G.W., Settipane, G.A. (1994) Long-term risk factors for developing asthma and allergic rhinitis: a 23-year follow-up study of college students. *Allergy Proceedings*. 15(1):21-25.
 269. Shamji, M.H., Durham, S.R. (2011) Mechanisms of immunotherapy to aeroallergens. *Clinical and Experimental Allergy*. 41(9): 1235-1246.
 270. Sharma, S., Sharma, A., Kumar, S., Sharma, S.K., Ghosh, B. (2006) Association of TNF haplotypes with asthma, serum IgE levels, and correlation with serum TNF-alpha levels. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. Oct; 35(4):488-495.
 271. Sharon, M., Wahl, C., Wanjun, C. (2005) Transforming growth factor- β -induced regulatory T cells referee inflammatory and autoimmune diseases *Arthritis Resiparoty Therzpies*. 7(2):62-68.
 272. Shevach, E.M. (2002) CD4 +CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nature Reviews Immunology*. Jun; 2(6):389–400.
 273. Shin, S.W., Oh, T.J., Park, S.M., Park, J.S., Jang, A.S., Park, S.W., Uh, S.T., An, S. (2011) Asthma-predictive genetic markers in gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells. *Allergy, Asthma and Immunological Research*. 3(4):265-272.
 274. Sibbald, B., Horn, M.E.C., Gregg, I. (1980) A family study of the genetic basis of asthma and wheezy bronchitis. *Archives of Disease in Childhood*. 55(5): 354-7.
 275. Smyk-Pearson, S.K., Bakke, A.C., Held, P.K., Wildin, R.S. (2003) Rescue of the autoimmune scurfy mouse by partial bone marrow transplantation or by injection with T-enriched splenocytes. *Clinical and Experimental Immunology*. Aug; 133(2):193-199.
 276. Smyth, D.J., Plagnol, V., Walker, N.M., Cooper, J.D., Downes, K., Yang, J.H., Howson, J.M., Stevens, H. (2008) Shared and distinct genetic variants in type 1 diabetes and celiac disease. *The New England Journal of Medicine*. 359(26): 2767-2777.
 277. Söderhäll, C., Marenholz, I., Kerscher, T., Rüschen-dorf, F., Esparza-Gordillo, J., Worm, M., Gruber, C., Mayr, G., Albrecht, M., Rohde, K., Schulz, H., Wahn, U., Hubner, N., Lee, Y.A. (2007) Variants in a novel epidermal collagen gene (COL29A1) are associated with atopic dermatitis. *PLoS Biology*. Sep; 5(9):242.
 278. Soref, C.M., Di, Y.P., Hayden, L., Zhao, Y.H., Satre, M.A., Wu, R..J. (2001) Characterization of a novel airway epithelial cell-specific short chain alcohol

- dehydrogenase/reductase gene whose expression is up-regulated by retinoids and is involved in the metabolism of retinol. *The Journal of Biology Chemistry*. Jun 29; 276(26):24194-24202.
279. Sørbye, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J.C., Brown, P.O., Botstein, D., Lønning, P.E., Børresen-Dale, A.L. (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* Sep 11; 98(19):10869-10874.
 280. Spijksma, F.T. (1993) Aerobiology of common environmental allergens: sizes of allergen carrying particles. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. Jun; 11(1):93-94.
 281. Stampfli, M.R., Cwiartka, M., Gajewska, B.U. (1999) Interleukin-10 gene transfer to the airway regulates allergen mucosal sensitization in mice. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. Nov; 21(5):586–596.
 282. Stekel, D. (2003). *Microarray Bioinformatics*. Cambridge University Press, UK, Chapter 8, pp. 139-182.
 283. Strachan, D.P. (1989) Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 299(6710):1259–60.
 284. Sturm, E.M., Schratl, P., Schuligoi, R., Konya, V., Sturm, G.J., Lippe, I.T., Peskar, B.A., Heinemann, A. (2008) Prostaglandin E2 inhibits eosinophil trafficking through E-prostanoid 2 receptors. *Journal of Immunology*. 181(10): 7273-7283.
 285. Subiza, J., Feo Brito, F., Pola, J., Moral, A., Fernández, J., Jerez, M. (1998) Pólenes alergénicos y polinosis en 12 ciudades españolas. *Revista Española de Alergología e Inmunología Clínica*. 13:45-48.
 286. Subramaniana, A., Tamayoa, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Goluba, T.R., Landera, E. S., Mesirova, J. P. (2005) Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *PNAS*. 25; 102(43):15545-15550.
 287. Sumi, T., Fukushima, A., Nishino, K., Fukuda, K., Kumagai, N., Nishida, T., Ueno, H. (2009) Treatment with FTY720 during the induction or effector phase suppresses the development of experimental allergic conjunctivitis in mice. *Cellular Biology International*. 33(4): 534-541.
 288. Sumpter, T.L., Payne, K.K., Wilkes, D.S. (2008) Regulation of the NFAT pathway discriminates CD4+CD25+ regulatory T cells from CD4+CD25- helper T cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 83(3):708-717.
 289. Suzuki, Y., Yoshimaru, T., Matsui, T., Inoue, T., Niide, O., Nunomura, S., Ra, C. (2003) Fc epsilon RI signaling of mast cells activates intracellular production of hydrogen peroxide: role in the regulation of calcium signals. *Journal of Immunology*. 171(11):6119–6127.
 290. Takenaka, H., Zhang, K., Diaz-Sanchez, D., Tsien, A., Saxon, A. (1995) Enhanced human IgE production results from exposure to the aromatic hydrocarbons from diesel exhaust: direct effects on B-cell IgE production. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Jan;95(1 Pt 1):103-115.
 291. Takkouche, B., González-Barcala, F. J., Etminan, M., Fitzgerald, M. (2008) Exposure to furry pets and the risk of asthma and allergic rhinitis: a meta-analysis. *Allergy*. 63(7):857–864.

292. Till S.J., Francis, J.N., Nouri- Aria, K., Durham, S.R. (2004) Mechanisms of immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 113(6):1025-1034.
293. Togias, A.G. (2000) Systemic immunologic and inflammatory aspects of allergic rhinitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 106(5 Suppl):S247-S250.
294. Trautmann, A., Akdis, M., Kleemann, D., Altnauer, F., Simon, H. U., Graeve, T., Noll, M. (2000) T cell-mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *Journal of Clinical Investigation*. 106(1): 25–35.
295. Trautmann, A., Schmid-Grendelmeier, P., Kruger, K., Cramer, R., Akdis, M., Akkaya, A., Brocker, E.B. (2002) T cells and eosinophils cooperate in the induction of bronchial epithelial cell apoptosis in asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 109(2): 329–337.
296. Tsitoura, D.C., Blumenthal, R.L., Berry, G. (2000) Mechanisms preventing allergen-induced airways hyperreactivity: role of tolerance and immune deviation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Aug; 106(2):239–246.
297. Tsuji, M., Komatsu, N., Kawamoto, S., Suzuki, K., Kanagawa, O., Honjo, T., Hori, S., Fagarasan, S. (2009) Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3⁺ T cells in gut Peyer's patches. *Science*. Mar 13; 323(5920): 1488–1492.
298. Tyner, J.W., Kim, E.Y., Ide, K., Pelletier, M.R., Roswit, W.T., Morton, J.D., Bataille, J.T., Patel, A.C., Patterson, G.A., Castro, M., Spoor, M.S., You, Y., Brody, S.L., Holtzman, M.J. (2006) Blocking airway mucous cell metaplasia by inhibiting EGFR antiapoptosis and IL-13 transdifferentiation signals. *Journal of Clinical Investigation*. 116(2): 309-321.
299. Unger, W.W., Hauet-Broere, F., Jansen, W. (2003) Early events in peripheral regulatory T cell induction via the nasalmucosa. *Journal of Immunology*. Nov 1; 171(9):4592–4603.
300. van Neerven, R.J., Wikborg, T., Lund, G., Jacobsen, B., Brinch-Nielsen, A., Arned, J., Ipsen, H. (1999) Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activation of CD4⁺ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. *Journal of Immunology*. Sep 1; 163(5):2944-2952.
301. Vela, C., Platas, C., Gurbindo, C., Tricas, L., Subiza, E., García, R. y Lahoz, C. (1982) Fractionation and biological characterization of *Olea europaea* pollen extract. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*. 68: 289.
302. Vercelli, D. (2008a) Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nature Reviews Immunology*. Mar; 8(3):169-182.
303. Vercelli, D. (2008b) Advances in asthma and allergy genetics in 2007. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Aug; 122(2):267-271.
304. Villalba, M., Batanero, E., López-Otín, C., Sánchez, L.M., Monsalve, R.I., González de la Peña, M.A., Lahoz, C., Rodríguez, R. (1993) The amino acid sequence of Ole e I, the major allergen from olive tree (*Olea europaea*) pollen. *European Journal of Biochemistry*. 216(3):863-869.
305. Villalba, M., Lopez-Otin, C., Martin-Orozco, E., Monsalve, R.I., Palomino, P., Lahoz, C., Rodriguez, R. (1990) Isolation of three allergenic fractions of the major allergen from *Olea europea* pollen and N-terminal amino acid

- sequence. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 172(2):523-528.
306. Vinay, P., Lewis, W.H. (1986) Pollen morphology, allergenicity and aerobiology of the Oleaceae. 3rd International Conference on Aerobiology, Basilea (Abstract 56).
 307. Vladich, F.D., Brazille, S.M., Stern, D. (2005) IL-13 R130Q, a common variant associated with allergy and asthma, enhances effector mechanisms essential for human allergic inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 115(3):747-754.
 308. Von Mutius, E. (2004) Influences in allergy: Epidemiology and the environment. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 113(3): 373-913.
 309. Von Mutius, E., Martinez, F.D., Fritzsche, C., Nicolai, T., Roell, G., Thiemann, H.H. (1994) Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. Feb; 149 (2 Pt 1):358-364.
 310. Wachholz, P.A., Durham, S.R. (2004) Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*. 4(4):313-318.
 311. Wachholz, P.A., Nouri-Aria, K.T., Wilson, D.R., Walker, S.M., Verhoef, A., Till, S.J., Durham, S.R. (2002) Grass pollen immunotherapy for hayfever is associated with increases in local nasal but not peripheral Th1:Th2 cytokine ratios. *Immunology*. Jan; 105(1):56-62.
 312. Wachholz, P.A., Soni, N.K., Till, S.J., Durham, S.R. (2003) Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*. 112(5):915-922.
 313. Waldeck, B. (2002) Beta-adrenoceptor agonists and asthma-100 years of development. *European Journal of Pharmacology*. 445(1-2): 1-12.
 314. Walker, E.J., Siminovitch, K.A. (2007) Primer: genomic and proteomic tools for the molecular dissection of disease. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. Oct; 3(10): 580-558.
 315. Walker, J.K.L., Penn, R.B., Bond, R.A. (2011) New perspectives regarding β 2-adrenoceptor ligands in the treatment of asthma. *British Journal of Pharmacology*. May; 163(1):18-28.
 316. Wallin, M.T., Page, W.F., Kurtzke, J.F. (2004) Multiple sclerosis in US veterans of the Vietnam era and later military service: race, sex, and geography. *Annals of Neurology*. 55(1):65-71.
 317. Wambre, E., Delong, J.H., James, E.A., Lafond, R.E., Robinson, D., Kwok, W.W. (2012) Differentiation stage determines pathologic and protective allergen-specific CD4(+) T-cell outcomes during specific immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 129(2): 544-551.
 318. Wan, Y.Y., Flavell, R.A. (2007) Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature*. Feb 15; 445(7129):766-770.
 319. Wang, Y., McCusker, C. (2006) Neonatal exposure with LPS and/or allergen prevents experimental allergic airways disease: development of tolerance using environmental antigens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Jul; 118(1):143-151.

320. Warner, J.O., Price, J.A. (1990) Aero-allergen avoidance in the prevention and treatment of asthma. *Clinical and Experimental Allergy*. Sep; 20 (Suppl 3):15-19.
321. Wei, J., Duramad, O., Perng, O.A., Reiner, S.L., Liu, Y.J., Qin, F.X. (2007) Antagonistic nature of T helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* Nov 13; 104(46):18169-18174.
322. Weidinger, S., Gieger, C., Rodriguez, E. (2008) Genome-wide scan on total serum IgE levels identifies FCER1A as novel susceptibility locus. *PLoS Genetics*. Aug; 4 (8):e1000166.
323. Westfall, P.H., Young, S.S. (1993) Resampling-Based Multiple Testing: Examples and Methods for p-Value Adjustment. *Biometrics*. September; 49: 941-945.
324. Wheeler, A.W. (1992) Hypersensitivity to the allergens of the pollen from the olive tree (*Olea europaea*). *Clinical and Experimental Allergy*. Dec; 22(12):1052-1057.
325. Wheeler, A.W., Hickman, B.E. y Fox, B. (1990) Heterogeneity of a major allergen from olive (*Olea europaea*) pollen. *Molecular Immunology*. 27: 631.
326. Wiedermann, U., Jahn-Schmid, B., Bohle, B. (1999) Suppression of antigen-specific T- and B-cell responses by intranasal or oral administration of recombinant bet v 1, the major birch pollen allergen, in a murine model of type I allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Jun: 103(6):1202–1210.
327. Williams, L. M., Rudensky, A. Y. (2007). Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nature Immunology*. Mar; 8(3): 277–284.
328. Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., Sakaguchi, S. (2008) CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function. *Science*. Oct 10; 322(5899): 271–275.
329. Woodruff, P.G., Boushey, H.A., Dolganov, G.M., Woodruff, P.G., Boushey, H.A., Dolganov, G.M., Barker, C.S., Yang, Y.H., Donnelly, S., Ellwanger, A., Sidhu, S.S., Dao-Pick, T.P., Pantoja, C., Erle, D.J., Yamamoto, K.R., Fahy, J.V. (2007) Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 104(40):15858-15863.
330. Woodruff, P.G., Modrek, B., Choy, D.F., Jia, G., Abbas, A.R., Ellwanger, A., Koth, L.L., Arron, J.R., Fahy, J.V. (2009) T-helper type 2-driven inflammation defines major subphenotypes of asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 180(5):388-395.
331. World Health Organization, National Heart, Lung, and Blood Institute (1995) Global strategy for asthma management and prevention, NHLBI/WHO workshop report. NIH-NHLBI pub n° 95:3959.
332. Xing, Y., Hogquist, K. A. (2012) T-Cell Tolerance: Central and Peripheral. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. Jun 1; 4(6).
333. Xu, Y.D., Cui, J.M., Wang, Y., Yin, L.M., Gao, C.K., Liu, Y.Y., Yang, Y.Q. (2010) The early asthmatic response is associated with glycolysis, calcium binding and mitochondria activity as revealed by proteomic analysis in rats. *Respiratory Research*. Aug 6; 11:107.

334. Xue, H., Field, C.J. (2011) New role of glutamate as an immunoregulator via glutamate receptors and transporters. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*. Jun 1; 3:1007-1020.
335. Yang, Z., Wang, K., Li, T. (1998) Childhood diabetes in China. Enormous variation by place and ethnic group. *Diabetes Care*. 21(4):525–529.
336. Yu, Q., Sharma, A., Oh, S.Y., Moon, H.G., Hossain, M.Z., Salay, T.M., Leeds, K.E. (2009) T cell factor 1 initiates the T helper type 2 fate by inducing the transcription factor GATA-3 and repressing interferon gamma. *Nature Immunology*. 10(9): 992–999.
337. Zhao, W., Guenard, H. (1994) Bronchial smooth muscle energetics: effect of iodoacetate and hypoxia. *Respiratory Physiology*. 96:285–296.
338. Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S. L., Jeker, L. T., Penaranda, C., Martínez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W., Bluestone, J.A. (2009) Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nature Immunology*. Sep; 10(9): 1000–1007.
339. Zuany-Amorim, C., Haile, S., Leduc, D. (1995) Interleukin-10 inhibits antigen-induced cellular recruitment into the airways of sensitized mice. *The Journal of Clinical Investigation*. Jun; 95(6):2644–2651.

ANEXO I

Rutas KEGG

Tabla 1. Rutas KEGG significativas fuera de la polinización

	ID	Ruta KEGG	N° genes	LOR	valor p	p ajustada
Grupo 5 vs Grupo 4	hsa05131	EPEC	48	-0,719747035	3,15E-08	9,72E-05
	hsa05130	Infección por E. coli patogénica	48	-0,719747035	3,15E-08	9,72E-05
	hsa03050	Proteasoma	38	-0,788630299	5,41E-08	0,00012511
	hsa00010	Glicólisis/Gluconeogénesis	58	-0,608942503	3,65E-07	0,00067525
	hsa00563	Biosíntesis acomplada a glicofosfatidilinositol (GPI)	22	-0,942254107	4,58E-07	0,00070536
	hsa04662	Ruta de señalización del receptor de células B	68	-0,545404583	9,62E-07	0,00127058
	hsa00510	Biosíntesis de B-glicanos	34	-0,734357617	1,90E-06	0,00219700
	hsa00020	Ciclo del citrato (ciclo TCA)	25	-0,792927895	8,86E-06	0,00910249
	hsa04330	Ruta de señalización Notch	50	-0,560162424	1,53E-05	0,01416731
	hsa04130	Interacciones SNARE en el transporte vesicular	50	-0,550084543	2,22E-05	0,01863208
	hsa04210	Apoptosis	93	-0,40109504	3,31E-05	0,02383093
	hsa00380	Metabolismo del triptófano	49	-0,54373221	3,35E-05	0,02383093
	hsa04640	Linaje celular hematopoyético	101	-0,378886288	4,57E-05	0,03019210
	hsa05330	Rechazo de aloinjerto	46	-0,543404162	5,89E-05	0,03631491
	hsa00030	Ruta de las pentosas fosfato	21	-0,768435678	8,25E-05	0,04476704
	hsa04310	Ruta de señalización Wnt	172	-0,283291344	8,29E-05	0,04476704
	hsa00190	Fosforilación oxidativa	71	-0,432282559	8,74E-05	0,04476704
	hsa05040	Enfermedad de Huntington	48	-0,518715035	9,34E-05	0,04476704
	hsa04620	Ruta de señalización de los receptores Toll-like	105	-0,356182171	9,68E-05	0,04476704
	hsa04080	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	283	0,374193475	1,99E-10	1,84E-06

Grupo 5 vs Grupo 3	ID	Ruta KEGG	N° genes	LOR	valor p	p ajustada
	hsa04080	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	283	0,499022145	5,31E-16	4,91E-12

	ID	Ruta KEGG	N° genes	LOR	valor p	p ajustada
Grupo 5 vs Grupo 2	hsa04080	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	283	-0,274557875	1,22E-10	5,64E-07
	hsa03010	Ribosoma	28	0,875453051	4,13E-15	3,82E-11
	hsa05330	Rechazo de aloinjerto	46	0,56277443	9,12E-10	2,39E-06
	hsa04612	Procesamiento antigénico y presentación	97	0,400160575	1,03E-09	2,39E-06
	hsa05332	Enfermedad injerto frente a huésped	53	0,471845106	6,35E-08	0,00011743
	hsa05340	Inmunodeficiencia primaria	36	0,553581063	1,01E-07	0,00015620
	hsa05320	Enfermedad tiroidea autoinmune	59	0,417200177	6,08E-07	0,00080271
	hsa03420	Reparación de nucleótidos por excisión	27	0,589473704	7,39E-07	0,00085426
	hsa04120	Proteólisis mediada por ubiquitinas	163	0,240587043	4,10E-06	0,00421310
	hsa04110	Ciclo celular	132	0,264388691	4,68E-06	0,00432430
	hsa04660	Ruta de señalización del receptor de células T	119	0,272454507	7,19E-06	0,00604574
	hsa05310	Asma	21	0,569508435	2,63E-05	0,02027008
	hsa04650	Citotoxicidad mediada por células Natural Killer	174	0,206121155	5,10E-05	0,03628655

Grupo 5 vs Grupo 1	No hay rutas KEGG diferenciales					
-------------------------------	--	--	--	--	--	--

	ID	Ruta KEGG	N° genes	LOR	valor p	p ajustada
Grupo 4 vs	hsa03010	Ribosoma	28	-1,290202188	3,31E-13	3,06E-09
	hsa05310	Asma	21	1,400688927	3,06E-09	1,42E-05

Grupo 3	hsa05330	Rechazo de aloinjerto	46	0,981568328	3,17E-08	9,78E-05
	hsa04620	Ruta de señalización de los receptores Toll-like	105	0,671308457	5,09E-08	0,00011775
	hsa05320	Enfermedad tiroidea autoinmune	59	0,828199693	2,64E-07	0,00048909
	hsa04940	Diabetes mellitus tipo I	59	0,814991721	4,29E-07	0,00066154
	hsa04630	Ruta de señalización Jak-STAT	205	0,414855121	3,85E-06	0,00509247
	hsa04514	Moléculas de adhesión celular (CAMs)	162	0,453620741	6,82E-06	0,00773007
	hsa04612	Procesamiento antigénico y presentación	97	0,576837703	8,02E-06	0,00773007
	hsa04060	Interacción receptores citocina-citocina	271	0,348855068	8,36E-06	0,00773007
	hsa04330	Ruta de señalización de Notch	50	0,76844063	1,29E-05	0,01081004
	hsa04920	Ruta de señalización de Adipocitocinas	82	0,601237401	1,80E-05	0,01327427
	hsa05110	Infección por Vibrio colerae	57	0,709449926	1,97E-05	0,01327427
	hsa04662	Ruta de señalización del receptor de células B	68	0,64884738	2,29E-05	0,01327427
	hsa05130	Infección por E. coli patogénica	48	0,75963363	2,43E-05	0,01327427
	hsa05131	EPEC	48	0,75963363	2,43E-05	0,01327427
	hsa05322	Lupus sistémico eritematoso	67	0,651301006	2,44E-05	0,01327427
	hsa04510	Adhesión focal	240	0,328235148	7,92E-05	0,04068020

	ID	Ruta KEGG	Nº genes	LOR	valor p	p ajustada
Grupo 4 vs Grupo 2	hsa04080	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	283	-0,340793153	1,31E-19	1,21E-15
	hsa05330	Rechazo de aloinjerto	46	0,620764874	9,18E-13	4,25E-09
	hsa04612	Procesamiento antigénico y presentación	97	0,408022486	1,60E-12	4,95E-09
	hsa04662	Ruta de señalización del receptor de células B	68	0,414119506	1,90E-09	4,40E-06
	hsa00010	Glicólisis/Gluconeogénesis	58	0,440182123	4,17E-09	6,71E-06
	hsa05332	Enfermedad injerto frente a huésped	53	0,460113823	4,71E-09	6,71E-06
	hsa04120	Proteólisis mediada por ubiquitininas	163	0,258207523	5,08E-09	6,71E-06
	hsa05320	Enfermedad tiroidea autoinmune	59	0,394698061	9,06E-08	0,00010469
	hsa00020	Ciclo del citrato (ciclo TCA)	25	0,624903604	1,13E-07	0,00011575
	hsa03050	Proteasoma	38	0,4876519	1,63E-07	0,00015080
	hsa04660	Ruta de señalización del receptor de células T	119	0,268869131	1,95E-07	0,00016429
	hsa03010	Ribosoma	28	0,56610073	2,64E-07	0,00020320
	hsa04940	Diabetes mellitus tipo I	59	0,376446242	3,27E-07	0,00023297
	hsa04210	Apoptosis	93	0,297708611	3,53E-07	0,00023328
	hsa04110	Ciclo celular	132	0,249087508	3,84E-07	0,00023671
	hsa04650	Citotoxicidad mediada por células Natural killer	174	0,213285915	6,21E-07	0,00035868
	hsa00190	Fosforilación oxidativa	71	0,330544291	8,01E-07	0,00043552
	hsa03420	Reparación de nucleótidos por excisión	27	0,548222221	8,98E-07	0,00044950
	hsa04130	Interacciones SNARE en transporte vesicular	50	0,393501622	9,23E-07	0,00044950
	hsa05130	Infección por E. coli patogénica	48	0,389634184	1,91E-06	0,00083966
	hsa05131	EPEC	48	0,389634184	1,91E-06	0,00083966
	hsa05012	Enfermedad de Parkinson	81	0,289879607	3,65E-06	0,00153242
	hsa00620	Metabolismo del piruvato	29	0,492120688	3,91E-06	0,00153242
	hsa05110	Infección por Vibrio colerae	57	0,345009801	3,98E-06	0,00153242
	hsa00510	Biosíntesis de N glicanos	34	0,441803785	6,19E-06	0,00229177
	hsa05310	Asma	21	0,572531356	6,64E-06	0,00236030
	hsa04310	Ruta de señalización Wnt	172	0,191962478	8,30E-06	0,00284436
	hsa00240	Metabolismo de pirimidinas	69	0,300596085	9,37E-06	0,00309608
	hsa04620	Ruta de señalización de los receptores Toll-like	105	0,242258648	1,05E-05	0,00335925
	hsa04514	Moléculas de adhesión celular (CAMs)	162	0,183598001	3,53E-05	0,01088429
	hsa05340	Inmunodeficiencia primaria	36	0,381999196	5,15E-05	0,01536786
	hsa03030	Replicación del DNA	25	0,447727428	8,63E-05	0,02494562
	hsa04664	Ruta de señalización de Fc epsilon RI	82	0,243577146	8,98E-05	0,02517491

	hsa03410	Reparación de bases por excisión	25	0,426303471	0,00017778	0,04790381
	hsa00563	Biosíntesis acomplada a glicofosfatidilinositol (GPI)	22	0,455613991	0,00018128	0,04790381

	ID	Ruta KEGG	Nº genes	LOR	valor p	p ajustada
Grupo 4 vs Grupo 1	hsa04080	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	283	-0,347717201	9,13E-10	1,60E-06
	hsa05130	Infección por E. coli patogénica	48	0,746730366	2,14E-11	9,92E-08
	hsa05131	EPEC	48	0,746730366	2,14E-11	9,92E-08
	hsa05330	Rechazo de aloinjerto	46	0,748405544	4,97E-11	1,53E-07
	hsa00190	Fosforilación oxidativa	71	0,5854235	3,92E-10	9,06E-07
	hsa05012	Enfermedad de Parkinson	81	0,538653704	1,04E-09	1,60E-06
	hsa04612	Procesamiento antigénico y presentación	97	0,492874399	1,34E-09	1,77E-06
	hsa00010	Glicólisis/Gluconeogénesis	58	0,603607303	4,92E-09	5,69E-06
	hsa05110	Infección por Vibrio colerae	57	0,601636961	7,52E-09	7,72E-06
	hsa04514	Moléculas de adhesión celular (CAMs)	162	0,355044649	3,98E-08	3,68E-05
	hsa00030	Ruta de las pentosas fosfato	21	0,904770442	5,41E-08	4,55E-05
	hsa05320	Enfermedad tiroidea autoinmune	59	0,541960879	1,53E-07	0,00011318
	hsa04670	Migración de leucocitos transendotelial	112	0,403226795	1,59E-07	0,00011318
	hsa04662	Ruta de señalización del receptor de células B	68	0,501663751	2,22E-07	0,00014650
	hsa00510	Biosíntesis de N-glicanos	34	0,682905624	2,96E-07	0,00018239
	hsa03050	Proteasoma	38	0,637495797	4,92E-07	0,00028444
	hsa00020	Ciclo del citrato (ciclo TCA)	25	0,747812635	1,23E-06	0,00067058
	hsa04620	Ruta de señalización de receptores Toll-like	105	0,370735051	3,52E-06	0,00177268
	hsa05040	Enfermedad de Huntington	48	0,530796954	3,64E-06	0,00177268
	hsa04130	Interacciones SNARE en transporte vesicular	50	0,514616693	4,89E-06	0,00225915
	hsa04940	Diabetes mellitus tipo I	59	0,475704885	5,20E-06	0,00229018
	hsa04330	Ruta de señalización	50	0,509583946	6,15E-06	0,00258584
	hsa00563	Biosíntesis acomplada a glicofosfatidilinositol (GPI)	22	0,730644177	9,05E-06	0,00363861
	hsa05332	Enfermedad injerto frente a huésped	53	0,485624131	9,98E-06	0,00384601
	hsa04120	Proteólisis mediada por ubiquitinas	163	0,286649675	1,16E-05	0,00428761
	hsa04650	Citotoxicidad mediada por células Natural Killer	174	0,273958931	1,58E-05	0,00561451
	hsa04210	Apoptosis	93	0,3613224	2,17E-05	0,00741908
	hsa00600	Metabolismo de esfingolípidos	25	0,652764115	2,80E-05	0,00925709
	hsa03410	Reparación de bases por excisión	25	0,643355201	3,73E-05	0,01189977
	hsa05120	Señalización epitelial por infección de E. coli	79	0,375028136	4,59E-05	0,01415245
	hsa01031	Estructura glicanos	62	0,401648471	0,00010061	0,03001708
	hsa00051	Metabolismo de la glucosa y manosa	33	0,529087829	0,00012882	0,03723412

	ID	Ruta KEGG	Nº genes	LOR	valor p	p ajustada
Grupo 3 vs Grupo 2	hsa04080	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	283	-0,371654403	9,83E-21	9,09E-17
	hsa04020	Ruta de señalización por calcio	241	-0,165597806	3,52E-05	0,02471476
	hsa03010	Ribosoma	28	0,892366983	7,64E-14	3,53E-10
	hsa04110	Ciclo celular	132	0,28864067	5,86E-09	1,81E-05
	hsa03420	Reparación de nucleótidos por excisión	27	0,645627203	1,49E-08	3,44E-05
	hsa04120	Proteólisis mediada por ubiquitinas	163	0,250273989	2,14E-08	3,96E-05
	hsa00190	Fosforilación oxidativa	71	0,31197135	3,83E-06	0,00589711
	hsa04612	Procesamiento antigénico y presentación	97	0,261499482	6,14E-06	0,00658562
	hsa04660	Ruta de señalización del receptor de células T	119	0,23626335	6,25E-06	0,00658562
	hsa03030	Replicación del DNA	25	0,522123086	6,41E-06	0,00658562
	hsa00240	Metabolismo de pirimidinas	69	0,29846625	1,31E-05	0,01212634
	hsa05330	Rechazo de aloinjerto	46	0,361249981	1,68E-05	0,01413036
	hsa05012	Enfermedad de Parkinson	81	0,264325421	2,94E-05	0,02264629

	hsa04210	Apoptosis	93	0,243682186	3,74E-05	0,02471476
	hsa03430	Reparación de errores mismatch	22	0,496576697	5,30E-05	0,03268930
	hsa05340	Inmunodeficiencia primaria	36	0,380000896	6,28E-05	0,03485753
	hsa00010	Glicólisis/Gluconeogénesis	58	0,298490045	6,41E-05	0,03485753
	hsa03410	Reparación de bases por excisión	25	0,451811735	8,06E-05	0,04142079
	hsa04650	Citotoxicidad mediada por células Natural Killer	174	0,170908368	8,60E-05	0,04185048
	hsa00020	Ciclo del citrato (ciclo TCA)	25	0,443425967	0,00010755	0,04973547

	ID	Ruta KEGG	Nº genes	LOR	valor p	p ajustada
Grupo 3 vs Grupo 1	hsa04080	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	283	-0,464185826	2,89E-14	2,67E-10
	hsa04060	Interacción receptores citocina-citocina	271	-0,318442164	1,80E-07	0,00033385
	hsa04020	Ruta de señalización por calcio	241	-0,261930184	4,42E-05	0,04084288
	hsa03010	Ribosoma	28	1,103691058	4,28E-12	1,98E-08
	hsa00190	Fosforilación oxidativa	71	0,650454307	5,91E-10	1,82E-06
	hsa05012	Enfermedad de Parkinson	81	0,571873705	7,86E-09	1,82E-05
	hsa03420	Reparación de nucleótidos por excisión	27	0,854397534	2,85E-07	0,00043993
	hsa03030	Replicación del DNA	25	0,863738288	5,76E-07	0,00076085
	hsa03410	Reparación de bases por excisión	25	0,839644862	1,25E-06	0,00144553
	hsa04120	Proteólisis mediada por ubiquitinas	163	0,331009959	3,94E-06	0,00405357

	ID	Ruta KEGG	Nº genes	LOR	valor p	p ajustada
Grupo 2 vs Grupo 1	hsa03010	Ribosoma	28	-0,642959943	2,38E-07	0,00109840
	hsa04110	Ciclo celular	132	-0,304868078	3,92E-07	0,00120976
	hsa04080	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	283	0,278421323	1,46E-10	1,35E-06

Tabla 2. Rutas KEGG significativas durante la polinización

	ID	Ruta KEGG	Nº genes	LOR	valor p	p ajustada
Grupo 5 vs Grupo 4	hsa04120	Proteolisis mediada por citocinas	163	-0,3662221	7,03E-12	3,25E-08
	hsa04210	Apoptosis	93	-0,4244311	3,17E-09	9,76E-06
	hsa04662	Ruta de señalización del receptor de células B	68	-0,4831065	1,40E-08	3,01E-05
	hsa04650	Citotoxicidad mediada por células Natural Killer	174	-0,2858096	1,93E-08	3,01E-05
	hsa04660	Ruta de señalización del receptor de células T	119	-0,3494946	1,96E-08	3,01E-05
	hsa05131	EPEC	48	-0,5034527	7,89E-07	0,00081087
	hsa05130	Infección por E.coli infecciosa	48	-0,5034527	7,89E-07	0,00081087
	hsa04110	Ciclo celular	132	-0,2821817	1,32E-06	0,00121644
	hsa04370	Ruta de señalización VEGF	85	-0,3540362	1,54E-06	0,00129467
	hsa05330	Rechazo de aloinjerto	46	-0,4595592	7,80E-06	0,00600815
	hsa00240	Metabolismo de pirimidinas	69	-0,3584778	1,18E-05	0,00838688
	hsa04664	Ruta de señalización de Fc epsilon RI	82	-0,3206746	1,66E-05	0,01099232
	hsa05221	Leucemia mieloide aguda	75	-0,3334756	1,94E-05	0,01152474
	hsa04910	Ruta de señalización por insulina	151	-0,2309316	1,99E-05	0,01152474
	hsa04310	Ruta de señalización por Wnt	172	-0,2120074	2,82E-05	0,01474728
	hsa03420	Reparación por excisión de nucleótidos	27	-0,5679848	4,23E-05	0,0201363
	hsa04115	Ruta de señalización p53	93	-0,2839991	4,36E-05	0,0201363
	hsa04150	Ruta de señalización mTOR	55	-0,3749082	4,57E-05	0,0201363
	hsa05220	Leucemia mieloide crónica	119	-0,2460644	5,62E-05	0,02361182
	hsa03020	RNA polimerasa	20	-0,6659563	6,49E-05	0,02607744
	hsa00190	Fosforilación oxidativa	71	-0,3182938	6,91E-05	0,02661619
	hsa05223	Cancer de pulmón "NON SMALL CELL"	76	-0,3047561	7,75E-05	0,02868339
	hsa05012	Enfermedad de parkinson	81	-0,2929612	8,50E-05	0,03022165
	hsa04620	Ruta de señalización con receptores Toll-like	105	-0,2519853	0,0001076	0,03688793
	sa04080	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	283	0,38182801	4,56E-19	4,22E-15
	hsa04020	Ruta de señalización del calcio	241	0,21978453	6,57E-07	0,00081087
	hsa04740	Trnaducción olfatoria	57	0,39993021	2,87E-05	0,01474728
Grupo 5 vs Grupo 3	hsa04120	Proteolisis mediada por ubiquitinas	163	-0,4415975	7,58E-14	3,51E-10
	hsa00190	Fosforilación oxidativa	71	-0,6138597	1,72E-11	5,30E-08
	hsa05012	En femedad de Parkinson	81	-0,5186541	7,65E-10	1,77E-06
	hsa03050	Proteasoma	38	-0,7327316	8,51E-09	1,57E-05
	hsa05131	EPEC	48	-0,6280135	1,60E-08	2,12E-05
	hsa05130	Infección por E.coli patogénica	48	-0,6280135	1,60E-08	2,12E-05
	hsa04110	Ciclo celular	132	-0,3609058	3,13E-08	3,62E-05
	hsa04310	Ruta de señalización por Wnt	172	-0,2991433	1,57E-07	0,00016179
	hsa00020	Ciclo del citrato (ciclo TCA)	25	-0,7816493	7,96E-07	0,00073655
	hsa03420	Reparación por excisión de bases	27	-0,7372736	1,05E-06	0,00088383
	hsa04662	Ruta de señalización del receptor de células B	68	-0,4123922	5,89E-06	0,00399292
	hsa04910	Ruta de señalización por insulina	151	-0,2753088	6,04E-06	0,00399292
	hsa00240	Metabolismo de la pirimidina	69	-0,3976245	1,06E-05	0,00653701
	hsa04150	Ruta de señalización mTOR	55	-0,4452167	1,14E-05	0,00660776
	hsa03010	Ribosoma	28	-0,6352537	1,28E-05	0,00695508
	hsa05215	Cancer de próstata	123	-0,2909233	1,58E-05	0,00814182
	hsa05221	Leucemia mieloide aguda	75	-0,3681955	2,05E-05	0,00999886
	hsa05223	Cancer de pulmón "NON SMALL CELL"	76	-0,3609354	2,62E-05	0,01212038
	hsa04115	Ruta de señalización p53	93	-0,3237455	2,97E-05	0,0130601
	hsa04660	Ruta de señalización del receptor de células T	119	-0,2847672	3,23E-05	0,01349462

	hsa04650	Citotoxicidad mediada por células Natural Killer	174	-0,2352273	3,36E-05	0,01349462
	hsa04010	Ruta de señalización MAPK	330	-0,1690498	4,35E-05	0,01676562
	hsa04210	Apoptosis	93	-0,3133313	5,28E-05	0,01952932
	hsa04664	Ruta de señalización de Fc epsilon RI	82	-0,3269009	7,49E-05	0,02626238
	hsa03020	RNA polimerasa	20	-0,6871637	7,67E-05	0,02626238
	hsa04620	Ruta de señalización por receptores Toll like	105	-0,2831134	0,0001032	0,03411517
	hsa05220	Leucemia mieloide crónica	119	-0,2640119	0,0001161	0,03704811
	hsa00010	Glicólisis/Gluconeogénesis	58	-0,3775438	0,0001230	0,03792911
	hsa03030	Replicación del DNA	25	-0,5804230	0,0001446	0,04315659
	hsa04080	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	283	0,36962101	3,05E-14	2,82E-10
	hsa04020	Ruta de señalización del calcio	241	0,24402258	1,87E-06	0,00144489

Grupo 5 vs Grupo 2	No hay rutas KEGG diferenciales					
-----------------------------------	--	--	--	--	--	--

Grupo 5 vs Grupo 1	hsa04120	Proteolisis mediada por ubiquitinas	163	-0,3494823	3,60E-08	0,00033328
	hsa04110	Ciclo celular	132	-0,3249829	3,96E-06	0,01221796
	hsa04080	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	283	0,2308204	2,42E-06	0,01121039

Grupo 4 vs Grupo 3	hsa00190	Fosforilación oxidativa	71	-0,9070413	2,64E-08	0,00024396
	hsa00982	Metabolismo drogas	50	-0,9815386	2,59E-07	0,00119559
	hsa00980	Metabolismo de xenobioticos por citocromo P450	48	-0,8810186	9,48E-06	0,02192277
	hsa05012	Enfermedad de Parkinson	81	-0,6843866	1,61E-05	0,02821776
	hsa03050	Proteasoma	38	-0,9436485	1,83E-05	0,02821776
	hsa03320	Ruta de señalización PPAR	76	-0,6821811	3,13E-05	0,0362078
	hsa00920	Metabolismo del azufre	18	1,25948733	3,45E-06	0,01062227
	hsa04210	Apoptosis	93	0,60168642	2,31E-05	0,03053204

Grupo 4 vs Grupo 2	hsa04080	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	283	-0,4675933	1,17E-25	1,09E-21
	hsa04020	Ruta de señalización por calcio	241	-0,2623311	4,55E-09	1,05E-05
	hsa00982	Metabolismo drogas	50	-0,4571980	1,44E-05	0,00699261
	hsa04120	Proteolisis mediada por ubiquitinas	163	0,38580606	1,26E-13	5,83E-10
	hsa04210	Apoptosis	93	0,43021502	6,03E-10	1,86E-06
	hsa04620	Ruta de señalización de receptores Toll-like	105	0,37404722	7,22E-09	1,25E-05
	hsa04662	Ruta de señalización de receptores de células B	68	0,47325479	8,14E-09	1,25E-05
	hsa04660	Ruta de señalización de receptores de células T	119	0,31553752	1,54E-07	0,00020364
	hsa04650	Citotoxicidad mediada por células Natural Killer	174	0,25546236	2,31E-07	0,00026702
	hsa05212	Cáncer de páncreas	115	0,31438891	2,73E-07	0,00028071
	hsa05330	Rechazo de aloinjerto	46	0,50515685	5,12E-07	0,00047382
	hsa04110	Ciclo celular	132	0,27668905	1,11E-06	0,00093343
	hsa05211	Carcinoma de células renales	115	0,29295776	1,55E-06	0,00119115
	hsa04310	Ruta de señalización Wnt	172	0,23286174	2,63E-06	0,00186998
	hsa05130	Infección por E.coli patogénica	48	0,44552726	4,37E-06	0,0026929
	hsa05131	EPEC	48	0,44552726	4,37E-06	0,0026929
	hsa03050	Proteasoma	38	0,50021546	6,00E-06	0,00346647
	hsa04612	Procesamiento antigénico y presentación	97	0,29524733	8,68E-06	0,00472263
	hsa05220	Leucemia crónica mieloide	119	0,26413209	9,76E-06	0,00501525
	hsa05332	Enfermedad injerto frente a huésped	53	0,39276095	1,67E-05	0,00774086
	hsa03420	Reparación por excisión de bases	27	0,56743821	2,15E-05	0,00948059
	hsa05221	Leucemia crónica mieloide	75	0,31345234	3,43E-05	0,01441448
	hsa05210	Cáncer colorectal	114	0,25053692	3,92E-05	0,01578132
	hsa04370	Ruta de señalización VEGF	85	0,28140284	7,00E-05	0,02698899

	hsa04130	Interacciones SNARE en el transporte vesicular	50	0,36181549	0,0001066	0,03945142
	hsa05215	Cáncer de próstata	123	0,22344167	0,0001347	0,04791691
Grupo 4 vs Grupo 1	hsa04080	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	283	-0,4835329	2,15E-15	1,70E-11
	hsa00591	Metabolismo del ácido linoleico	27	-0,8184124	3,85E-05	0,01618553
	hsa04020	Ruta de señalización del calcio	241	-0,2595243	6,90E-05	0,02773426
	hsa05012	Enfermedad de parkinson	81	0,84861985	4,45E-15	1,70E-11
	hsa00190	Fosforilación oxidativa	71	0,90193973	5,51E-15	1,70E-11
	hsa05130	Infección por E.coli patogénica	48	0,9915645	1,31E-12	2,43E-09
	hsa05131	EPEC	48	0,9915645	1,31E-12	2,43E-09
	hsa04612	Procesamiento antgénico y presentación	97	0,69971052	1,75E-12	2,69E-09
	hsa03050	Proteasoma	38	1,04575761	2,49E-11	3,15E-08
	hsa05330	Rechazo de aloinjerto	46	0,95174455	2,73E-11	3,15E-08
	hsa04650	Citotoxicidad mediada por células Natural Killer	174	0,46716684	3,71E-10	3,82E-07
	hsa05332	Enfermedad injerto frente a huésped	53	0,78091933	5,19E-09	4,80E-06
	hsa04210	Apoptosis	93	0,55874948	3,78E-08	3,18E-05
	hsa00020	Ciclo del citrato (ciclo TCA)	25	0,98194503	3,71E-07	0,00028575
	hsa00010	Glucolisis/Gluconeogenesis	58	0,63504588	7,34E-07	0,0005219
	hsa05320	Enfermedad tiroide autoinmune	59	0,62676684	8,29E-07	0,00054759
	hsa03010	Ribosoma	28	0,8800327	1,55E-06	0,0009529
	hsa04662	Ruta de señalización del receptor de células B	68	0,56811375	1,69E-06	0,00097644
	hsa05322	Lupus sistémico eritematoso	67	0,55933523	2,90E-06	0,00157722
	hsa04940	Diabetes mellitus tipo I	59	0,57495102	6,32E-06	0,00324865
	hsa00240	Metabolismo de pirimidinas	69	0,52897077	7,26E-06	0,00353619
	hsa05212	Cáncer de páncreas	115	0,40436058	1,04E-05	0,00479002
	hsa04640	Linaje celular hematopoyético	101	0,43018848	1,09E-05	0,00479002
	hsa04150	Ruta de señalización mTOR	55	0,52329504	7,39E-05	0,02849532
	hsa04920	Ruta de señalización de adipocitocinas	82	0,42226476	9,97E-05	0,03686902
	hsa04310	Ruta de señalización Wnt	172	0,29050495	0,0001151	0,04097537
	hsa04620	Ruta de señalización por receptores Toll-like	105	0,36953252	0,0001200	0,0411249
Grupo 3 vs Grupo 2	hsa04080	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	283	-0,4846112	1,38E-20	1,28E-16
	hsa04020	Ruta de señalización de calcio	241	-0,3029256	1,11E-08	1,71E-05
	hsa04120	Proteólisis mediada por ubiquitinas	163	0,45710166	8,53E-16	3,94E-12
	hsa03050	Proteasoma	38	0,80593184	7,66E-11	2,36E-07
	hsa04620	Ruta de señalización por receptores Toll-like	105	0,41475385	4,12E-09	9,52E-06
	hsa04310	Ruta de señalización Wnt	172	0,31835827	7,97E-09	1,47E-05
	hsa04110	Ciclo celular	132	0,35050152	2,52E-08	3,33E-05
	hsa05130	Infección por E.coli patogénica	48	0,55547659	1,33E-07	0,00013625
	hsa05131	EPEC	48	0,55547659	1,33E-07	0,00013625
	hsa05215	Cáncer de próstata	123	0,33103019	3,79E-07	0,00035044
	hsa03420	Reparación por excisión de bases	27	0,71982536	5,85E-07	0,00049164
	hsa05212	Cáncer de páncreas	115	0,32649465	1,27E-06	0,00097948
	hsa04662	Ruta de señalización del receptor de células B	68	0,40669875	3,40E-06	0,00242162
	hsa00020	Ciclo del citrato (ciclo TCA)	25	0,68882157	3,68E-06	0,00242857
	hsa04520	Unión adherente	147	0,26772064	7,58E-06	0,00467222
	hsa05211	Carcinoma de células renales	115	0,29799041	1,00E-05	0,00553528
	hsa04612	Procesamiento antigénico y presentación	97	0,32379192	1,02E-05	0,00553528
	hsa05210	Cáncer colorectal	114	0,29656315	1,21E-05	0,00619896
	hsa04210	Apoptosis	93	0,3267291	1,29E-05	0,0062916
	hsa05220	Leucemia mieloide crónica	119	0,28394156	1,89E-05	0,0084977
	hsa05332	Enfermedad injerto frente a huésped	53	0,42387464	1,93E-05	0,0084977

	hsa05330	Rechazo de aloinjerto	46	0,45268869	2,17E-05	0,00912798
	hsa05221	Leucemia aguda mieloide	75	0,34455474	3,58E-05	0,01437661
	hsa04130	Interacciones SNARE en el transporte vesicular	50	0,40615774	6,92E-05	0,02665062
	hsa00190	Fosforilación oxidativa	71	0,32922061	0,0001221	0,04518976

Grupo 3 vs Grupo 1	hsa04080	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	283	-0,3773106	5,90E-08	5,46E-05
	hsa00190	Fosforilación oxidativa	71	1,22084959	1,74E-30	1,61E-26
	hsa05012	Enfermedad de Parkinson	81	1,0888313	3,78E-27	1,75E-23
	hsa03050	Proteasoma	38	1,33874375	5,80E-21	1,79E-17
	hsa05130	Infección por E.coli patogénica	48	1,02403469	6,04E-15	1,12E-11
	hsa05131	EPEC	48	1,02403469	6,04E-15	1,12E-11
	hsa00020	Ciclo del citrato (ciclo TCA)	25	1,2062349	8,46E-12	1,30E-08
	hsa04612	Procesamiento antigénico y presentación	97	0,66278434	1,80E-11	2,38E-08
	hsa03010	Ribosoma	28	0,98274885	1,17E-08	1,36E-05
	hsa05332	Enfermedad injerto frente a huésped	53	0,72526304	3,47E-08	3,57E-05
	hsa00010	Glicolisis/Gluconeogenesis	58	0,67140254	1,26E-07	0,00010573
	hsa04310	Ruta de señalización Wnt	172	0,40600808	2,00E-07	0,00015383
	hsa05322	Lupus sistémico eritematoso	67	0,61566154	2,62E-07	0,00018633
	hsa05330	Rechazo de aloinjerto	46	0,72076907	3,31E-07	0,00021873
	hsa00510	Biosíntesis de N-glicanos	34	0,77544782	1,79E-06	0,00110379
	hsa04120	Proteólisis mediada por ubiquitinas	163	0,35265698	1,35E-05	0,00782326
	hsa00240	Metabolismo de pirimidinas	69	0,51329652	1,98E-05	0,01077635
	hsa04150	Ruta de señalización mTOR	55	0,56010522	2,68E-05	0,01376318
	hsa05216	Cancer de tiroides	42	0,62857691	2,94E-05	0,01432727
	hsa03420	Reparación de bases por excisión	27	0,75641255	3,50E-05	0,01617218
	hsa05110	Infección por Vibrio cholerae	57	0,54095384	3,92E-05	0,01725731

Grupo 2 vs Grupo 1	hsa04120	Proteólisis mediada por ubiquitinas	163	-0,3920554	2,24E-10	1,04E-06
	hsa04110	Ciclo celular	132	-0,3263507	2,16E-06	0,004286
	hsa04620	Ruta de señalización de receptores Toll-like	105	-0,3262976	2,37E-05	0,03647944
	hsa04080	Interacción de los ligandos-receptores neuroactivos	283	0,35603045	3,65E-12	3,37E-08
	hsa00190	Fosforilación oxidativa	71	0,52753889	4,42E-07	0,00136287
	hsa05012	Enfermedad de Parkinson	81	0,45751617	2,32E-06	0,004286
	hsa04020	Ruta de señalización de calcio	241	0,22564599	3,35E-05	0,04423023

Heat-maps

Figura 1. Controles No alérgicos vs sujetos Asintomáticos fuera del periodo de polinización

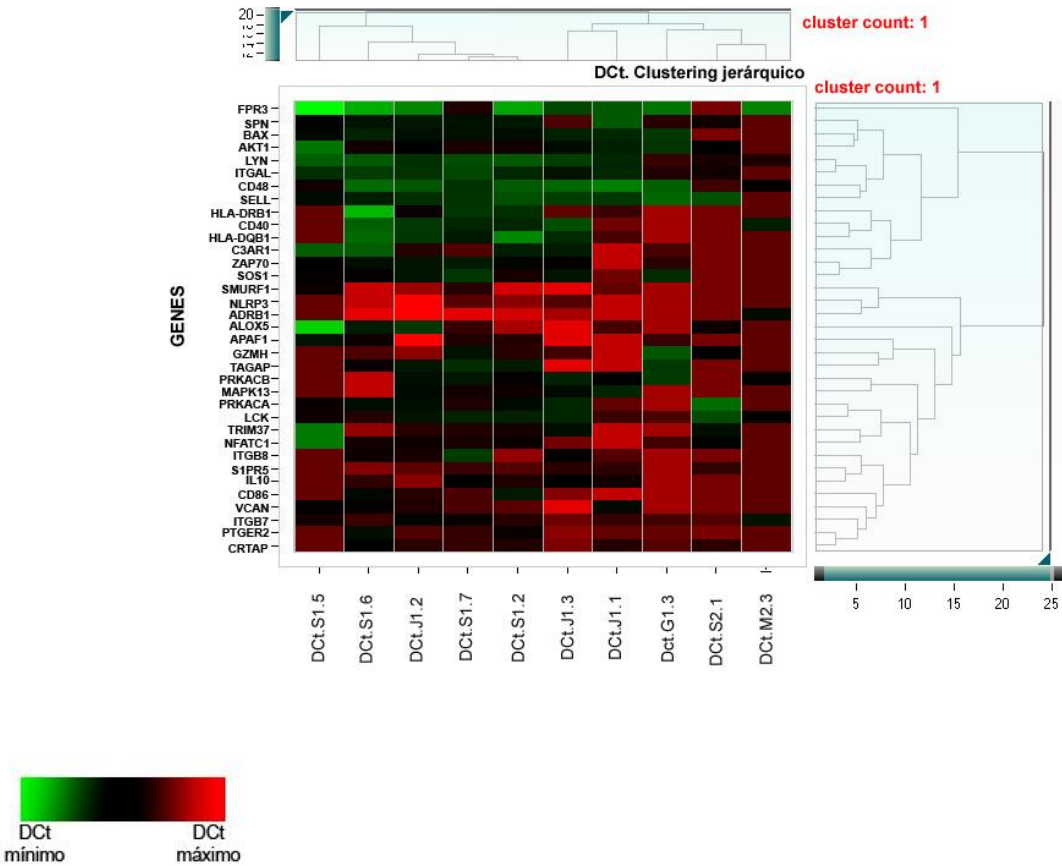


Figura 2. Controles No alérgicos vs Alérgicos no relacionados al polen de olivo fuera del periodo de polinización

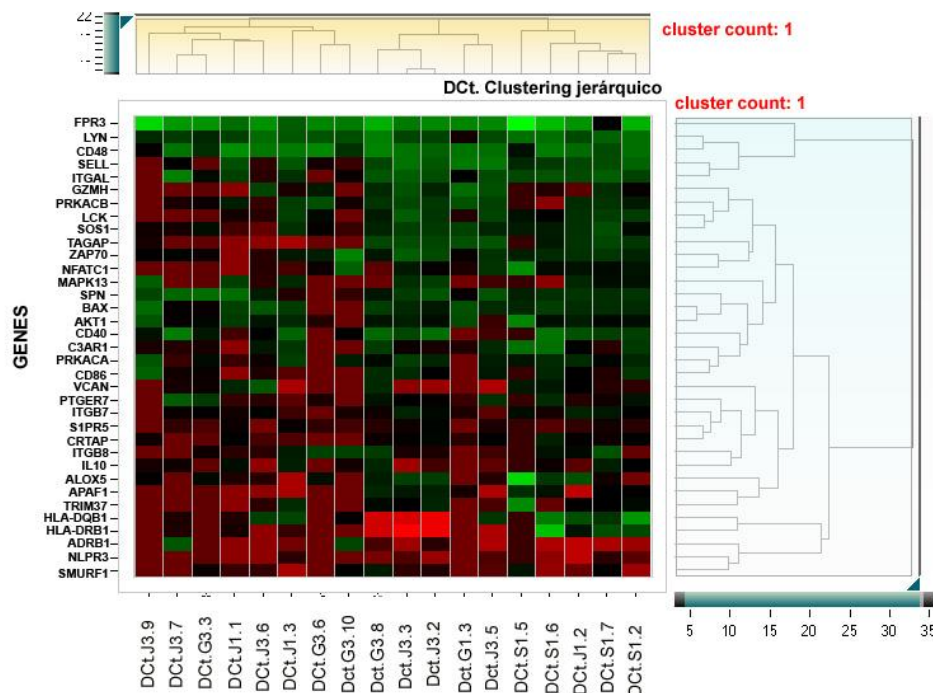


Figura 3. Controles No alérgicos vs Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento fuera del periodo de polinización

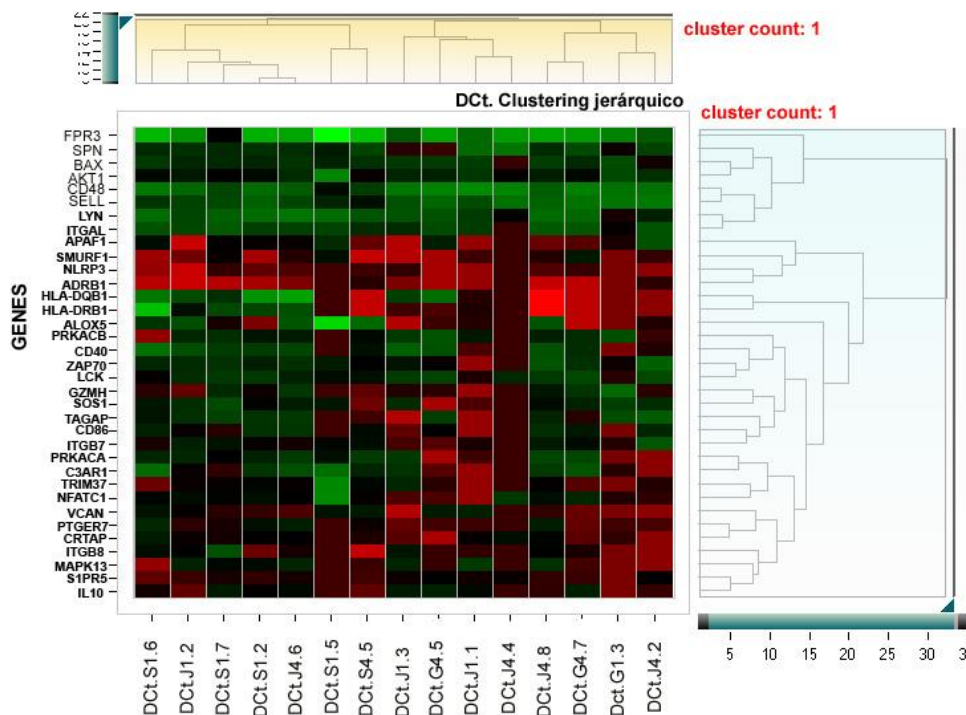


Figura 4. Controles No alérgicos vs Alérgicos al polen de olivo con tratamiento específico fuera del periodo de polinización

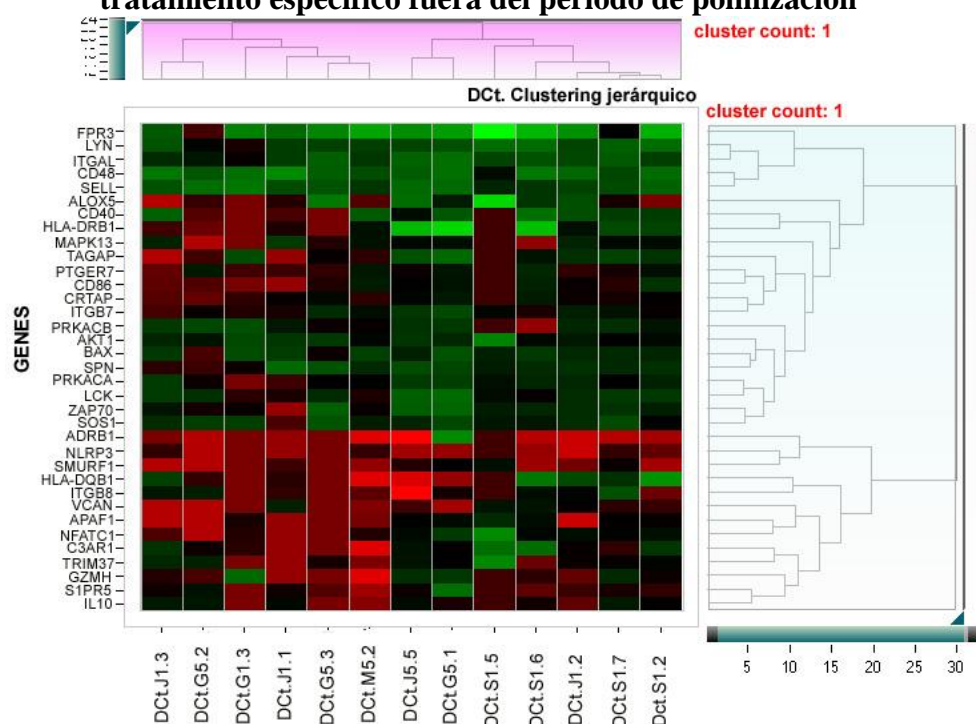


Figura 5. Controles No alérgicos dentro (Pre) y fuera del periodo de polinización (Post)

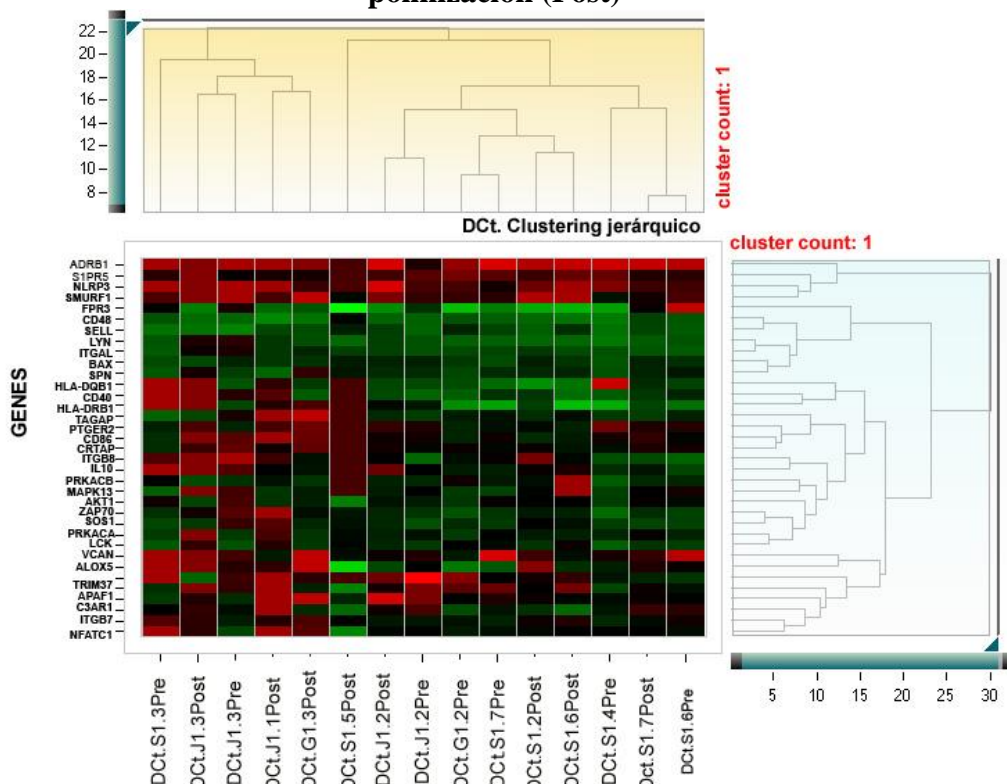


Figura 6. Sujetos Asintomáticos dentro (Pre) y fuera del periodo de polinización (Post)

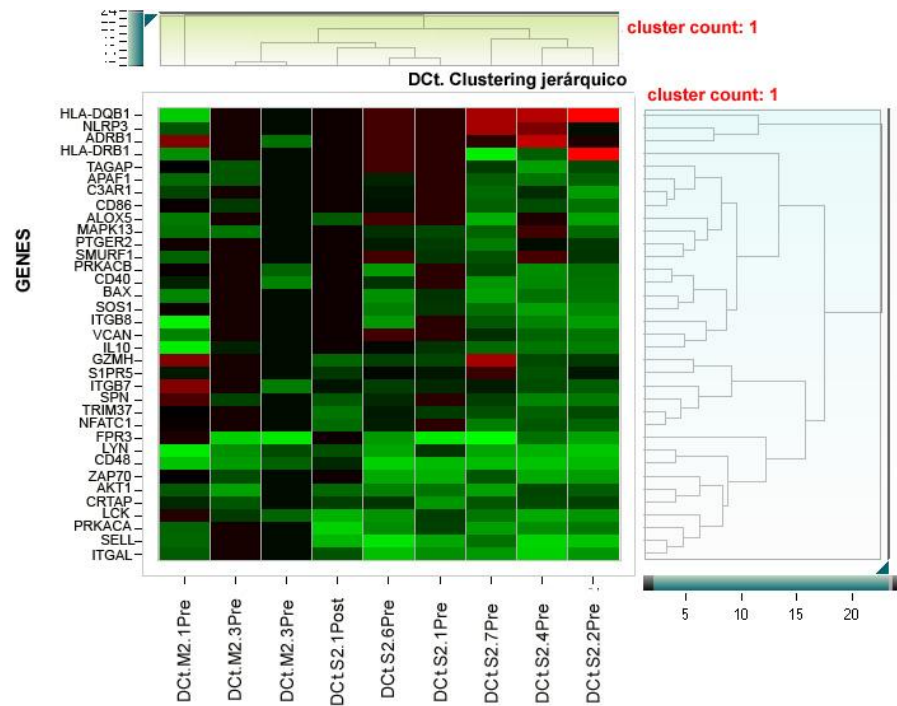


Figura 7. Alérgicos no relacionados dentro (Pre) y fuera del periodo de polinización (Post)

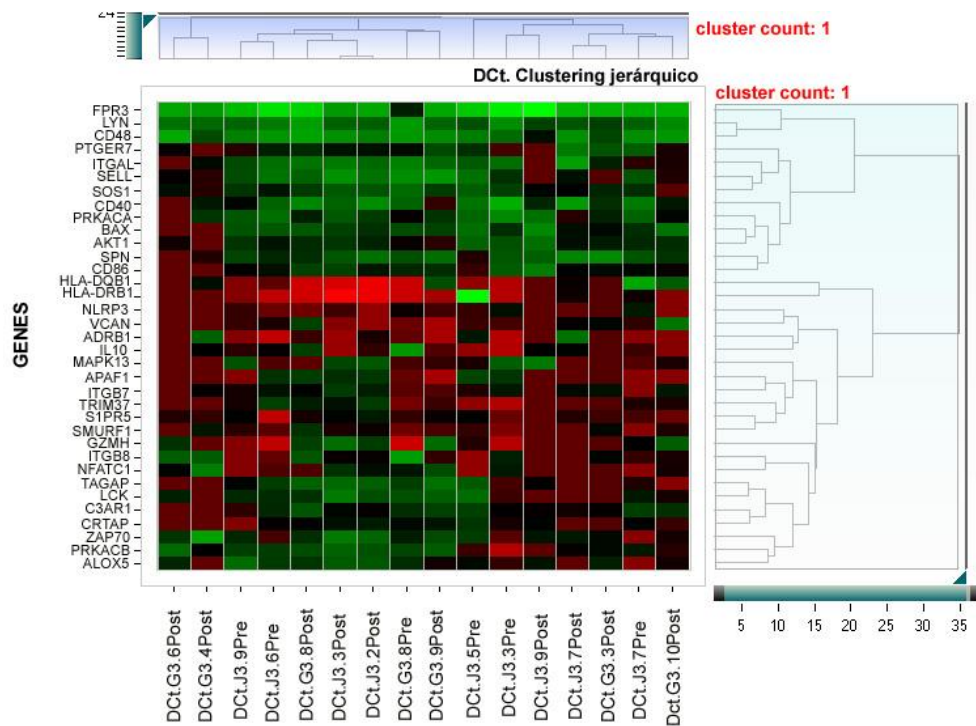


Figura 8. Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento dentro (Pre) y fuera del periodo de polinización (Post)

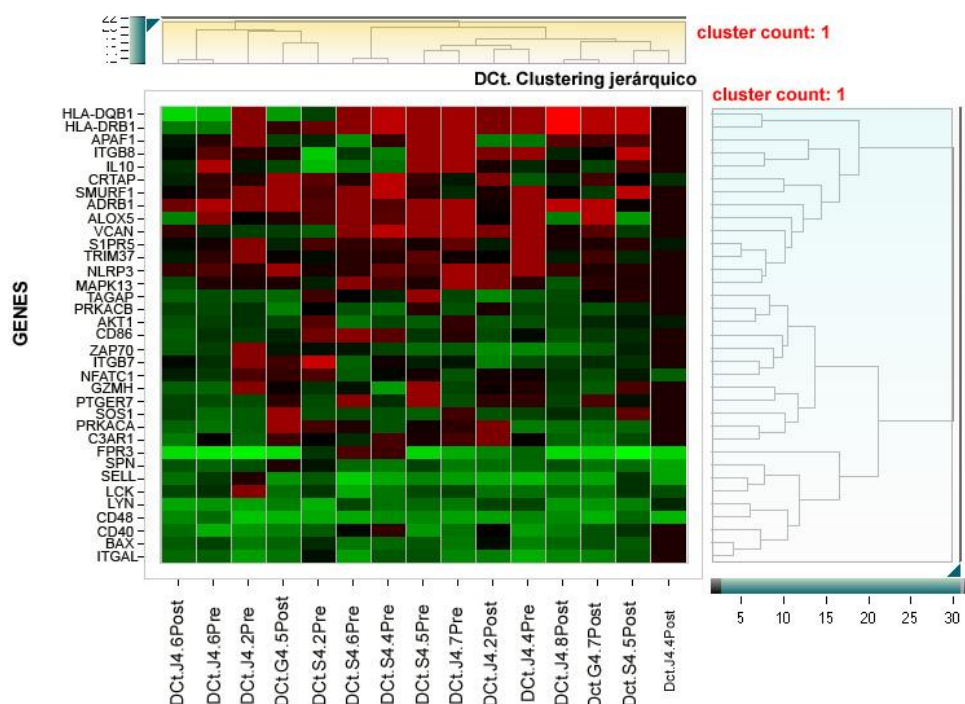
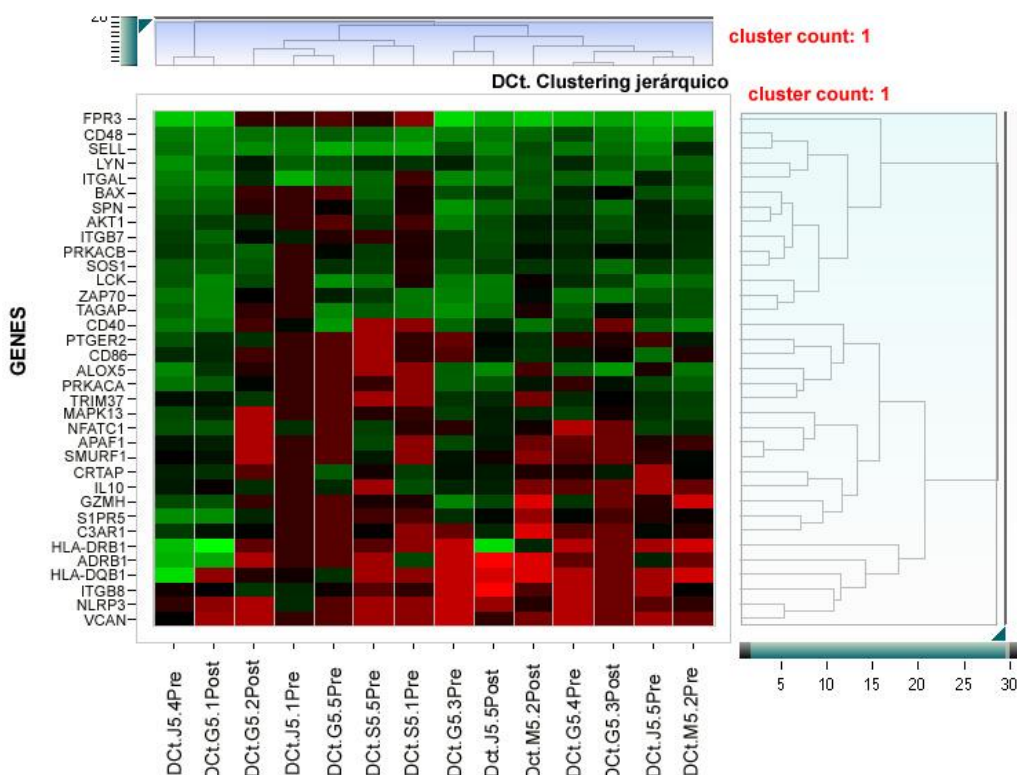


Figura 9. Alérgicos al polen de olivo con tratamiento específico dentro (Pre) y fuera del periodo de polinización (Post)



ANEXO II

